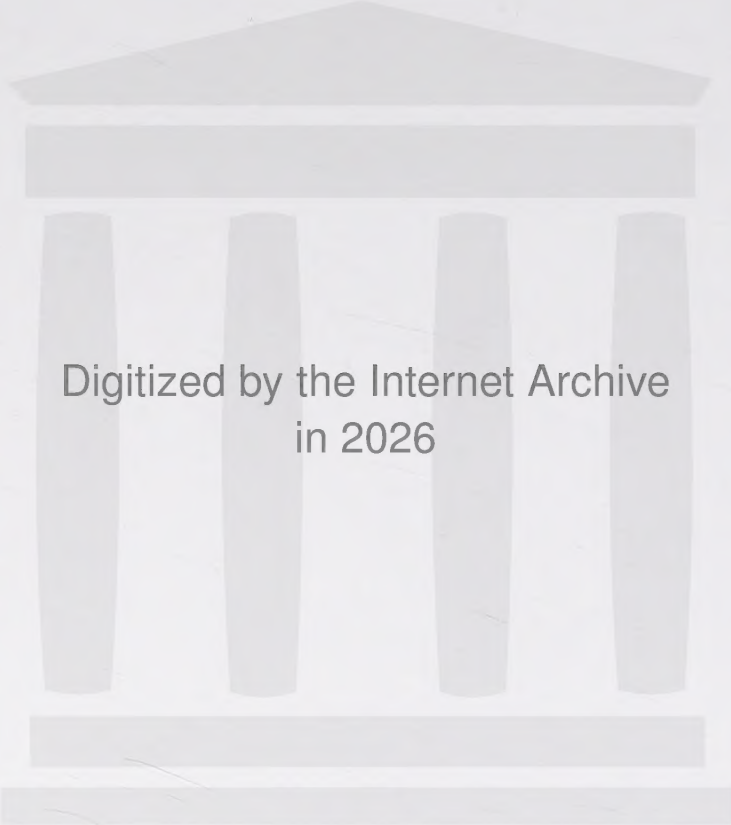


**Direkter Nachweis der Wechselwirkung von
Proteasen und Proteaseninhibitoren**

Rudolf Schuster

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem biochemischen Laboratorium
der HNO-Universitätsklinik München
Direktor : Professor Dr. med. H. H. Naumann

Direkter Nachweis der Wechselwirkung
von
Proteasen und Proteaseninhibitoren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Schuster
aus
Unterpfaffenhofen b. München

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz.Dr.rer.nat.K.Hochstraßer

Mitberichterstatter : Prof. Dr.med. H.H.Naumann

Dekan : Prof. Dr.med. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 25.6.1974



Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Hochstraßer schulde ich für die Überlassung des Themas und die Gewährung eines Arbeitsplatzes großen Dank.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für freundliche Beratung und Hilfe.

Inhaltsübersicht

=====

	Seite
I. Einleitung.	1
II. Theoretischer Teil.	2
1. Definition der Begriffe Proteasen und Proteaseninhibitoren.	2
2. Reaktionsmechanismus der Proteolyse und Wechselwirkung von Proteasen und Proteaseninhibitoren.	4
3. Beispiele für die Funktion von Proteasen und Proteaseninhibitoren.	5
III. Ergebnisteil.	9
1. Voraussetzungen für die vorgelegten Befunde.	9
2. Untersuchungsergebnisse.	11
IV. Experimenteller Teil.	33
1. Methoden.	33
2. Untersuchungsgang,	36
a) Materialgewinnung	36
b) Proteinbestimmung	36
c) Bestimmung der Enzymhemmung	36
d) Denaturierende Säurebehandlung zum Nachweis maskierten Inhibitors	37
e) Modifizierungsreaktion	37
f) Mancini - Test	38
g) Simultan - Immunelektrophorese.	39
V. Diskussion.	44
Zusammenfassung.	47
Literaturverzeichnis.	48

I. Einleitung . =====

Lebewesen, mithin also auch der Mensch, sind Systeme, die umwelttoffen sind. Diese Eigenschaft ermöglicht zum einen zwar die Versorgung des Organismus mit allen lebensnotwendigen Stoffen, birgt aber gleichzeitig das Risiko des Eindringens pathogener Substanzen in sich. Um dieses Risiko nach Möglichkeit auszuschließen, hat der Organismus eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt und zwar vor allem überall dort, wo er mit der Umwelt in so unmittelbarem Kontakt steht wie z.B. im Respirationstrakt. Einen der verschiedenen Abwehrmechanismen stellen hier die phagocytierenden Leukocyten dar. Extravasal zerfallende Leukocyten setzen aber sehr wirksame Proteasen frei, die nicht nur die eindringenden Erreger, sondern auch das eigene Gewebe angreifen, also ihrerseits pathogen wirken können. Um das zu verhindern stehen den Proteasen Antagonisten gegenüber : die natürlichen Proteaseninhibitoren, von denen in der vorliegenden Arbeit die Rede sein soll. Dabei interessiert vor allem der direkte Nachweis der Wechselwirkung von Proteasen und Inhibitoren und zwar durch :

1. Bestimmung der Konzentration von Inhibitoren und Inhibitor - Proteasenkomenplexen in physiologischen und pathologischen Nasensekreten,
2. Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukocytenproteasen und α_1 -Antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten.

II. Theoretischer Teil . =====

1. Definition der Begriffe Proteasen und Proteaseninhibitoren (1)

Proteasen bzw. ihre Inhibitoren finden sich in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben, in Drüsensekreten und im Blutserum. Chemisch gesehen handelt es sich dabei entweder um hochmolekulare Eiweißkörper oder relativ niedermolekulare Polypeptide, die gegenüber anderen Proteinen in der Aminosäurezusammensetzung oder in anderen Eigenschaften keine Besonderheiten zeigen. Die Proteasen einerseits werden durch ihre Fähigkeit, Peptidbindungen zu spalten, charakterisiert. Die Proteaseninhibitoren wiederum sind gekennzeichnet durch ihr Vermögen, die Wirkung verschiedener proteolytischer Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Thrombin von Pilz- und Bakterienproteasen aufzuheben.

Eine weitergehende Einteilung der Proteasen und ihrer Inhibitoren gelingt unter Berücksichtigung der von ihnen katalysierten Reaktion bzw. der chemischen Natur des für diese Reaktion verantwortlichen aktiven Zentrums. So lassen sich bei den Proteasen Exo- und Endopeptidasen unterscheiden, je nachdem ob sie die Peptidkette ihres Substrats vom Ende her oder an bestimmten Stellen in der Mitte aufspalten. Zu diesen letzteren, die vorwiegend auf Proteine und höhere Polypeptide wirken und daher auch Proteinasen heißen, zählen die Proteasen Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, sowie die Kathepsine der Gewebe und der weißen Blutzellen. Die Exopeptidasen greifen, wie bereits erwähnt, nur am Ende einer Peptidkette an: die Carboxypeptidasen vom Carboxylende, wobei wiederum manche Aminosäuren bevorzugt werden, die Amino-peptidasen vom Aminoende her.

Macht man nun nicht den Reaktionsmechanismus, sondern die Natur des aktiven Zentrums zum Kriterium einer Klassifizierung, so lassen sich die Proteasen in drei oder sogar vier Gruppen einteilen. Dabei bildet dann das Pepsin gewissermaßen eine eigene Klasse, da es eine Carboxylgruppe im aktiven Zentrum enthält. Die zweite

Gruppe, zu der vor allem die Exopeptidasen gehören, benötigt zu ihrer Aktivität zweiwertige Metallionen. Eine dritte Gruppe bilden die SH - Enzyme, die durch SH - Reagenzien gehemmt werden. Enzyme, welche Serin im aktiven Zentrum enthalten, werden schließlich in der Gruppe der sogenannten Serinenzyme zusammengefaßt. Hierher gehören z.B. neben Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Elastase vor allem die hochspezifischen und für Regulationsmechanismen wichtigen Proteasen Kallikrein (2) und Thrombin (3).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen sind die Proteasen nicht auf bestimmte Substrate, d.h. Proteine, eingestellt. Trotzdem aber besitzen sie - durch die Reaktionsbeteiligung der spezifisch strukturierten Umgebung der aktiven Zentren und ihre dreidimensionale Anordnung bedingt - insofern Substratspezifität, als sie innerhalb der Peptidketten nur bestimmte Stellen angreifen, die durch die Art der Aminosäurereste charakterisiert werden.

Was nun die Proteaseninhibitoren betrifft, so zeigen diese hinsichtlich ihrer Substratspezifität ein recht unterschiedliches Verhalten. Neben Inhibitoren, die mit einem verhältnismäßig breiten Spektrum von Proteasen reagieren können, sind wiederum auch spezielle, nur gegen die substratspezifischen Proteasen wirksame Hemmstoffe bekannt. Durch die Substratspezifität wird gleichzeitig eine gewisse Einteilung der Inhibitoren möglich. So läßt sich z.B. die Gruppe der Trypsininhibitoren unterscheiden, Inhibitoren also, die vor allem imstande sind, die Protease Trypsin abzubinden. Auch bei diesen Inhibitoren hat die Suche nach dem reaktiven Zentrum zu einer weiteren Unterteilung in zwei Klassen geführt. Diese Hemmstoffe enthalten nämlich in ihren sogenannten aktiven oder reaktiven Zentren definierte Lysin - oder Argininreste, die für ihre Funktion essentiell sind. Man spricht daher von Lysin- bzw. Arginininhibitoren. Die Zugehörigkeit eines Inhibitors zu einer der beiden Arten kann dabei leicht entschieden werden: Lysininhibitoren werden durch Acylierung der ϵ -Aminogruppen der Lysinreste inaktiviert, während Arginininhibitoren ihre Aktivität bei Acylierung behalten.

2. Reaktionsmechanismus der Proteolyse und Wechselwirkung von Proteasen und Proteaseninhibitoren.(5)

Die Endopeptidasen des Magen - Darm - Traktes werden, wie man seit längerem weiß (6,7,8,9), in Form inaktiver Enzymvorstufen, sogenannter Zymogene, gebildet. Erst durch bestimmte Umwandlungen (10) entstehen daraus dann die aktiven Proteasen. Bei diesen Umwandlungsreaktionen treten nun nachgewiesenermaßen Konformationsänderungen ein, die im Falle der Serinenzyme dazu führen, daß zwei bestimmte Aminosäurereste, nämlich Serin und Histidin in enge Nachbarschaft gelangen. Mit Hilfe spezieller Blockierungsreaktionen (11) läßt sich zeigen, daß diese beiden Aminosäurereste am katalytischen Vorgang der Proteolyse maßgeblich beteiligt sind. Diesem Befund zufolge kann man den Wirkungsmechanismus der Proteasen in Form einer Zwei-Stufen-Reaktion erklären : unter Beteiligung des Histidinrestes als Protonendonator bzw. -acceptor wird zunächst zwischen dem Serin der Protease und der Carboxylgruppe der angegriffenen Peptidbindung eine Esterbindung gebildet, die dann in zweiter Stufe hydrolysiert wird und zwar unter Freisetzung der Spaltprodukte und Regenerierung des Enzyms in der ursprünglichen Form.

Die Kenntnis der Vorgänge, die sich bei der Proteolyse abspielen und einige weitere Befunde, die sich bei Untersuchungen über die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum von Trypsininhibitoren und über die Inaktivierbarkeit dieser Zentren ergaben, erlauben nun auch eine Erklärung für das Zustandekommen der Hemmwirkung natürlicher Trypsininhibitoren. Diese nämlich gehen mit den Proteasen Komplexverbindungen ein, wobei die ersten Reaktionsschritte einer Proteolyse durchlaufen werden, ohne daß jedoch dann aus dieser Reaktion das Trypsin und die Reaktionsprodukte frei würden. Infolge der spezifischen Raumstruktur der Inhibitoren wird nämlich die Proteolyse auf einer bestimmten Stufe der Reaktionsfolge unterbrochen bzw. limitiert. Die Hemmwirkung des Inhibitors kommt also durch eine limitierte Proteolyse des Inhibitors zustande.

7. Beispiele für die Funktion von Proteasen und Proteasen-inhibitoren .

Am Beginn des theoretischen Teils wurde es bereits erwähnt : Proteasen sind eiweißspaltende Enzyme. Sie bauen Proteine ab, man könnte auch sagen : sie verdauen Proteine. Daher ist es ganz natürlich, daß man Proteasen insbesondere im Verdauungstrakt findet, wo sie das Fremdeiweiß der Nahrung in seine Bausteine zerlegen und diese dann dem Stoffwechsel zuführen. An diesen Reaktionen beteiligt sind vor allem das Pepsin, das eiweißspaltende Enzym des Magens, sowie das Trypsin und das Chymotrypsin, die beide vom Pankreas sezerniert werden. Nun wird aber durch diese Verbindungen nicht nur der Abbau von Nahrungsprotein in die Wege geleitet, es besteht vielmehr auch die Gefahr, daß körpereigenes Eiweiß verdaut wird, da die Substratspezifität der Spaltenzyme ja nicht auf ein bestimmtes Eiweiß, sondern auf Bindungstypen ausgerichtet ist, die gleichermaßen Bestandteil der körperfremden wie der körpereigenen Proteine sind. Diese Gefahr abzuwenden wäre nun Aufgabe eines Inhibitors. Tatsächlich hat sich herausgestellt, daß das Pankreas verschiedener Spezies einen Trypsininhibitor enthält, der synchron mit dem Trypsinogen secerniert wird. Es wird angenommen, daß der Inhibitor die katalytische Aktivierung von Trypsinogen und damit weiterer Pankreasenzyme im Parenchym und Gangsystem verhindern soll, die durch geringe Mengen an aktivem Trypsin ausgelöst werden kann. Das Pankreas ist auf diese Weise in gewissem Maße vor Autolyse geschützt (12,13). Erst bei massiver Enzymaktivierung vermag der physiologische Inhibitorpool das aktivierte Trypsin nicht mehr abzufangen.

Eiweißverdauung ist jedoch nicht nur ein Charakteristikum des Magen - Darm - Traktes, sie ist ebenso überall dort anzutreffen, wo körpereigenes Zellmaterial zugrunde gegangen bzw. fremdes Zellmaterial in den Körper eingedrungen ist, unter Verhältnissen also, wie man sie z.B. bei Verwundungen findet. Jede traumatische Schädigung im Gewebe führt einerseits zu einer Aktivierung der Phagozyten, d.h. von Zellen, die funktionslos gewordene Zellbestandteile in sich aufnehmen und mit Hilfe von verschiedenen katalytischen Enzymen, die in der Peripherie und der Phagozyten lokalisiert sind, intra- und extrazellulär verdauen. Daneben kommt es aber durch die Frei-

setzung von Gewebsproteasen, sowie von proteolytischen Enzymen extravasal zerfallender Leukocyten zu einer Aktivierung des Kallikrein - Kinin - Systems, das seinerseits den Schock oder die Entzündungssymptomatik (14) - dolor, calor, rubor, tumor - verstärkt. Die Aktivierung der Kallikreine erfolgt dabei durch limitierte Proteolyse etwa im Sinne der Aktivierung der Pankreasproteasen. Die Kallikreine wiederum sind selbst hochspezifische Proteasen, die ihrerseits die Kininfreisetzung durch begrenzte Proteolyse katalysieren. Wird das Entzündungsproblem in dieser Weise gesehen, so ist es keineswegs überraschend, daß endogene Proteaseninhibitoren wie das α_1 - Antitrypsin und das α_2 - Makroglobulin oder exogene Hemmstoffe das Entzündungsgeschehen beeinflussen können.

Entzündungsgeschehen bzw. Verwundungen, das sind beides Vorgänge, die in enger Beziehung zu einem weiteren System stehen, innerhalb dessen Proteasen und Proteaseninhibitoren eine bedeutende Rolle spielen. Gemeint ist hier das Blut mit seinen Phänomenen der Fibrinolyse und der Blutgerinnung. Nachgewiesenermaßen werden im Verlauf des Gerinnungsgeschehens bestimmte inaktive Faktoren nur durch bestimmte aktive Faktoren aktiviert. So werden offensichtlich als Folge einer limitierten Proteolyse im Fibrinogen durch die trypsinähnliche Spezifität des Thrombins definierte Peptidbindungen gespalten und monomeres Fibrin und niedermolekulare Bruchstücke gebildet (15). Den Aktivatoren der Kaskade steht eine Reihe von natürlichen Thrombininhibitoren des Serums (Antithrombine) gegenüber, die das Gerinnungssystem physiologischerweise steuern und so eine fortschreitende Thrombosierung verhindern. Neben dem α_2 - Makroglobulin und dem Antithrombin III, die als Thrombininaktivatoren wirken, sei hier kurz der in Rinderorganen vorkommende polyvalente Proteaseninhibitor (Kunitz - Inhibitor, 16) erwähnt, der klinisch unter dem Namen Trasylol Bedeutung erlangte. Von diesem Hemmstoff ist bekannt, daß er neben Trypsin auch Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Pronase und Papain hemmt. Daneben konnte nachgewiesen werden (17), daß eine starke Hemmwirkung gegenüber dem Antihäemophiliefaktor besteht und daß die Entstehung aktiver Gewebsthrombo-kinase aus Plasmin- und Thrombocytenfaktoren gehemmt wird, wenn Antithrombin III in Gegenwart von Thrombin hinzugefügt wird.

Analog den Vorgängen bei der Bildung des Blutgerinnsels ist die Auflösung des Thrombins wieder die Folge der Einwirkung eines proteolytischen Enzyms. Das in Frage kommende Enzym, Plasmin, tritt normalerweise nicht in aktiver Form auf, sondern tritt im Fall aus einer inaktiven Form aktiviert werden. Die Aktivierungsvorgänge, die noch nicht einigermassen aufgeklärt sind, beruhen wahrscheinlich auf einer Reihe von initiierten proteolytischen Vorgängen. Plasmin selbst stellt ein proteolytisches Enzym dar, dessen Spezifität der des Trypsins relativ ähnlich ist. Infolge dieser Substratspezifität wurde zunächst angenommen, daß alle Trypsininhibitoren gute Hemmstoffe für Plasmin sind. Es ergab sich jedoch, daß neben Trypsin-Plasmininhibitoren auch streng spezifische Trypsininhibitoren vorkommen. Stark inhibiert wird die Plasminwirkung vor allem durch polyvalente Inhibitoren, die neben Trypsin auch Chymotrypsin und Kallikrein hemmen. Was die spezifischen Trypsininhibitoren anlangt, so findet man auch bei diesen gegen Plasmin unwirksamen Inhibitoren eine starke Hemmung im Falle der thrombelastographischen Untersuchung der Fibrinolyse. Man kann sich eine doppelte Wirkung von Proteaseninhibitoren auf das fibrinolytische System ableiten - einmal die Hemmung dieses Vorgangs aus der Endstufe der Plasminaktivierung durch Inhibition der Plasminwirkung selbst und als zweite Möglichkeit: die Inaktivierung der proteolytischen Vorgänge bei der Plasminaktivierung.

Sieht man nun aber einmal von den proteolytischen Vorgängen und deren Inhibition im Bereich der Gerinnung und der Fibrinolyse ab, so enthält Blutplasma eine Reihe von Proteinen mit Inhibitoreigenschaften für verschiedene Proteasen. Entsprechend ihrer Lage im Elektropherogramm oder aufgrund anderer Charakteristiken lassen sich fünf Proteaseninhibitoren unterscheiden. Es handelt sich dabei um das Antichymotrypsin, den Inter- α -Trypsininhibitor, das α_2 -Makroglobulin, den C 1 Inaktivator und das Antithrombin III. Schließlich besteht die α_1 -Globulinfraktion des Serums in der Hauptsache aus einem Protein mit Hemmeigenschaften gegen Proteasen: dem α_1 -Antitrypsin. Das α_1 -Antitrypsin wurde 1955 erstmals von Schultz und Mitarbeitern beschrieben. Der chemischen Struktur nach ist es ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 12 % und einem Molekulargewicht von etwa 45 000. Bei seiner Aminosäurezusammensetzung fällt

auf, daß es kein Cystin enthält, was auf einen Mangel an Disulfidbrücken schließen läßt. Daher erklärt sich auch die rasche Inaktivierung bei pH - Werten unter 5. 1962 entdeckte man die Eigenschaft des α_1 - Antitrypsin als Trypsin-inhibitor; sie macht ungefähr 90 % der Gesamt - Trypsin - Inhibitorkapazität des menschlichen Serums aus. α_1 - Antitrypsin ist ein Inhibitor mit sehr weitem Hemmspektrum. Es vermag Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, leukocytaire und acrosonale Bakterien - und Pilzproteasen zu hemmen. Über die physiologische Funktion des α_1 - Antitrypsins konnte man trotz dieser Tatsachen lange Zeit nur spekulieren. Dies änderte sich, als zwei entscheidende Beobachtungen gemacht wurden : einmal entdeckte Laurell, daß beim Menschen homozygot oder heterozygot vererbte Gendefekte vorkommen, die zu einem fast vollständigen oder teilweisen Ausfall des α_1 - Antitrypsin produzierenden Systems führen, zum zweiten wurde frühzeitig erkannt, daß die homozygoten Merkmalsträger praktisch immer an einem obstruktiven Lungenemphysem und häufig zusätzlich an Bronchiektasien erkranken. Damit war eigentlich klar, daß in den Lungenalveolen und Bronchien dieser Patienten Prozesse ablaufen müssen, die offensichtlich nur durch den Mangel an α_1 - Antitrypsin möglich werden können. Da ja α_1 - Antitrypsin als Funktionsprotein ein Proteaseninhibitor ist, war anzunehmen, daß die Prozesse, die bei Mangel an α_1 - Antitrypsin ablaufen, proteolytischer Natur sein müssen.

Im Laufe der letzten Jahre wurden zahlreiche Beobachtungen gemacht, die diese Hypothese bestätigen sollen und von denen die wichtigsten hier aufgeführt seien :

1. Proteasen aus Leukocyten oder Makrophagen können Lungengewebe andauern. Dieser Effekt kann durch α_1 - Antitrypsin in vitro verhindert werden.
2. Elastase kommt in Leukocyten vor; sie verändert infolge ihrer Spezifität die Dehnbarkeit der Lungenalveolen. Elastase kann durch α_1 - Antitrypsin gehemmt werden.
3. α_1 - Antitrypsin vermag Subtilisin, eine Bakterienprotease und Pronase, eine Pilzprotease, zu hemmen.
4. Sputum von α_1 - Antitrypsinmangelkranken enthält

Lungenemphysem oder Sputum bei bronchialen Affektionen enthält proteolytische Aktivität. Diese Aktivität ist durch α_1 -Antitrypsin weitgehend hemmbar.

5. Kallikrein als kininliberierende Protease wirkt hochkonstriktorisch. Kallikrein wird aber durch α_1 -Antitrypsin gehemmt.
6. Die Empfindlichkeit der konstriktorischen Rezeptoren der Bronchien wird durch Applikation von Proteasen gesteigert.
7. Durch Verabreichung von pflanzlichen Proteasen, die durch Seruminhibitoren nicht gehemmt werden, können experimentell beim Tier leicht Lungenemphysem und Bronchiektasien erzeugt werden.
8. Bei Arbeitern der Detergentienindustrie, die proteasehaltigen Staub inhalieren, werden bronchopulmonale Affektionen beobachtet.

Alle diese Beobachtungen stellen aber nur indirekte Beweise für die Beteiligung proteolytischer Prozesse bei der Pathogenese bestimmter bronchopulmonaler Erkrankungen dar. Ziel der angestellten Bemühungen war es daher, Methoden zu entwickeln, die gestatten, die Wechselwirkung zwischen Proteasen und Inhibitoren in den Sekreten - hier wurde als Untersuchungsmaterial Nasensekret verwendet - und Flüssigkeiten des Körpers direkt und quantitativ nachzuweisen.

III Ergebnisteil.

=====

1. Voraussetzungen für die vorgelegten Befunde.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Beobachtung von Haendle und Werle (18), daß das Nasensekret des Menschen eine starke Hemmwirkung gegen Trypsin und Chymotrypsin enthält. Die ursprüngliche Annahme, daß diese antiproteolytische Aktivität nur vom secernierten α_1 -Antitrypsin ausgeht, bestätigte sich nicht. Bei der Gelfiltration von konzentriertem Sekret zeigt sich nämlich an zwei Stellen des Elutionsdiagramms antitryptische Wirkung,

die von zwei verschiedene molekularen Inhibitoren verursacht wird. Weitere Aufarbeitung ergibt, daß im Durchschnitt nur 20 % der Hemmwirkung auf α_1 -Antitrypsin und etwa 80 % auf einen niedermolekularen Inhibitor entfallen. Über diesen niedermolekularen Inhibitor läßt sich folgendes (19,20,21) sagen :

Der Inhibitor ist wahrscheinlich als ein Produkt der Nasenschleimhaut anzusehen. Als Bildungsstätte kämen hier die Becherzellen oder tubuloazinösen Drüsen in Frage. Der Inhibitor ist polyvalent, hat ein Molekulargewicht von etwa 14000 und gehört zum Typ der Arginininhibitoren. In seinem Hemmspektrum gleicht er dem α_1 -Antitrypsin; wie dieses vermag er neben Trypsin und Chymotrypsin, die in einem Verhältnis von 1 : 2 inhibiert werden, auch Pronase und Leukocytenproteasen zu hemmen. Auch die proteolytische Aktivität purulenter Nasen- und Bronchialsekrete ist durch diesen Inhibitor hemmbar. Keine Wirkung zeigt er dagegen bei Kallikrein, Elastase, Plasmin und Subtilisin. Bei weiteren Versuchen mit inhibitorhaltigen Sekreten fiel auf, daß während des Konzentrationsverfahrens mit Hilfe der Druckdialysekammer die Hemmwirkung verloren gehen kann. Sie erscheint jedoch wieder, wenn die Sekrete deproteinisiert werden. Der Inhibitor geht also offensichtlich mit Proteasen, die bei diesen Manipulationen wahrscheinlich aus zerfallenden Leukocyten freigesetzt werden, eine Bindung ein. Er ist nun nicht mehr inhibitorisch aktiv und deshalb auch nicht mehr nachweisbar. Da der Inhibitor jedoch säurestabil ist, ist es möglich, ihn durch Denaturierung der Proteasen mittels 5 % Perchlorsäure freizusetzen, ihn inhibitorisch aktiv und damit wieder messbar zu machen. Führt man diese Behandlung auch bei nativen Sekreten durch, so stellt man fest, daß bereits in situ bestimmte Inhibitormengen maskiert, d.h. in proteasengebundener Form vorliegen. Ausgehend von dieser Eigenschaft des Inhibitors müßte es möglich sein, in einem Sekret den status quo der Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Proteasen im Zeitpunkt der Sekretentnahme direkt zu bestimmen und so die oben aufgeführten indirekten Anhaltspunkte für die Beteiligung proteolytischer Prozesse an verschiedenen pathologischen Vorgängen im Respirationstrakt zu klären.

2. Untersuchungsergebnisse .

Gewählt wurden als Untersuchungsmaterial zunächst Sekrete, die während eitriger Infektionen gewonnen worden waren und sehr niedrige Inhibitorgehalte aufwiesen, weil in diesen durch Bindung an leukocytaire Proteasen maskierter Inhibitor am ehesten vorzuliegen schien. In diesen Sekreten wurden die Inhibitorgehalte vor und nach Behandlung mit 5 % Perchlorsäure bestimmt und auf den Eiweißgehalt im Ausgangssekret bezogen. Zum Vergleich wurden auch die Sekrete gesunder Kontrollpersonen sowie die Sekrete von Patienten mit chronischen Infekten der Nasenhaut- und Nebenhöhlen auf die gleiche Weise untersucht.

Entgegen den ursprünglichen Erwartungen wurde durch die Säurebehandlung von Sekreten mit sehr niedrigen Inhibitorgehalten, die in den ersten Tagen akuter Infekte gewonnen worden waren, kein maskierter Inhibitor freigesetzt: die Werte bleiben konstant erniedrigt. Die Ursache für die Erniedrigung der Inhibitorkonzentrationen in dieser Phase der Infektion liegt also nicht in einer Komplexbildung mit leukocytären Proteasen, sondern in einer unzureichenden oder fehlenden Inhibitorproduktion. In einigen eitrigen Sekreten, die allerdings bereits vor der Säurebehandlung freien Inhibitor in Konzentrationen von etwa 5 - 8 ImU/mg Protein aufwiesen, kann in einzelnen Fällen durch die Unterteilung eine Zunahme der Inhibitorgehalte bis zu 100 % beobachtet werden. Nur in einzelnen Fällen sind Teile des Inhibitors durch Bindung an leukocytaire Proteasen maskiert. In anderen Fällen, die sich klinisch nicht eindeutig von den eben beschriebenen unterscheiden lassen, wird durch die Säurebehandlung eine Abnahme der Inhibitorkonzentration erreicht (s. Tab. I)

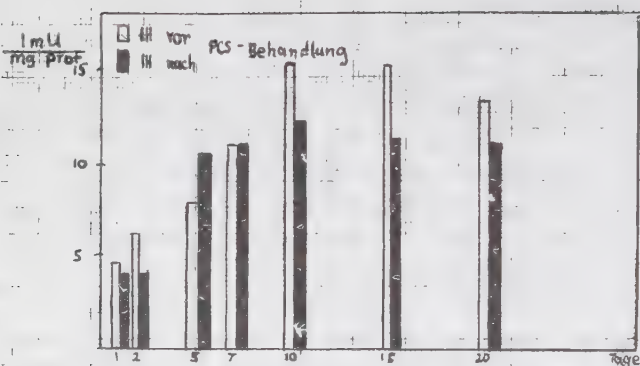


Abb. 1

Die Verlaufskontrolle eines akuten eitrigen Infektes mit Bestimmung der Inhibitorgehalte vor und nach Deproteinisierung (s. Abb 1), bestätigt diese Beobachtungen. In den ersten Tagen der Infektion, zum Zeitpunkt niedrigster Inhibitorkonzentrationen kann durch Enteiweißung kein maskierter Inhibitor freigesetzt werden. Erst in der Phase wiederansteigender Inhibitorproduktion ist der Nachweis maskierten Inhibitors möglich. Zum Höhepunkt der Inhibitorproduktion - wie in der weiteren Heilungsphase - wird durch Säurebehandlung der Inhibitorgehalt verringert. Die gleiche Feststellung läßt sich nach der Säurebehandlung physiologischer Sekrete machen, bei denen praktisch konstant ein Hemmverlust von 15 % auftritt (s. Tab. II)

Tabelle I

Inhibitorkonzentrationen im Nasensekret akuter Nasenhaupt- und Nebenhöhleninfekte vor und nach Perchlorsäurefällung :

vor ImU	nach ImU	Diagnose	
+5,1	9,0	eitrige Sinusitis	6. Tag
0,5	0,5	eitrige Sinusitis	2. Tag
5,5	1,7	eitrige Sinusitis	4. Tag
+8,8	15,6	eitrige Sinusitis	10. Tag
4,4	2,2	hyperplastische Sinusitis	6. Tag
6,0	6,0	hyperplastische Sinusitis	7. Tag
6,0	3,0	Rhinitis	4. Tag
1,1	0,9	Rhinitis	2. Tag
8,8	7,2	eitrige Sinusitis	10. Tag
+7,4	12,2	eitrige Sinusitis	6. Tag
6,6	6,0	eitrige Sinusitis	7. Tag
+9,0	17,8	eitrige Sinusitis	7. Tag
1,0	0,8	Rhinitis	2. Tag
4,6	3,8	Rhinitis	3. Tag
+7,8	10,5	eitrige Sinusitis	6. Tag
2,8	2,4	Sinusitis	3. Tag

+in diesen Fällen ist maskierter Inhibitor vorhanden

Tabelle II

Inhibitorkonzentrationen im Nasensekret gesunder Kontroll-
personen vor und nach Perchlorsäurefällung :

vor	nach	Erniedrigung	Diagnose
ImU	ImU	durch Fällung in %	
15,0	12,0	13	Focussuche
12,6	11,4	10	Focussuche
17,7	15,2	14	Cerumen obturans
15,1	12,1	20	Ohrmuschelplastik
16,2	13,6	16	Zungentumor
16,8	13,6	18	Focussuche
11,5	11,1	3	Atherom
14,2	11,2	21	Focussuche
11,5	10,2	12	Larynxpolyp
13,2	11,0	17	Submandibularisstein
21,4	17,6	18	Focussuche

Mittelwerte :

15,0	12,7	15
------	------	----

Tabelle III

Inhibitorkonzentrationen im Nasensekret von Patienten mit chronischen Nasennebenhöhleninfekten vor und nach Perchlorsäurefällung :

vor ImU	nach ImU	Diagnose
13,2	9,7	chronisch hyperplastische Sinusitis
21,0	17,2	Poliposis nasi
+ 0,6	2,2	chronisch rezidivierende Sinusitis
+ 0,2	1,3	chronisch rezidivierende Sinusitis
" 10,9	14,4	chronisch hyperplastische Sinusitis
" 4,0	7,9	chronisch rezidivierende Sinusitis
9,2	5,9	chronisch rezidivierende Sinusitis
4,3	2,6	chronisch eitrig Sinusitis
12,4	9,5	chronisch hyperplastische Sinusitis
7,2	5,1	Poliposis der Kieferhöhle
+ 6,4	9,8	rezidivierend eitrig Sinusitis
8,8	8,0	chronisch rezidivierende Sinusitis
9,4	7,8	chronisch hyperplastische Sinusitis
4,9	4,9	chronisch rezidivierende Sinusitis
6,5	4,0	chronisch rezidivierende Sinusitis
5,8	5,8	chronisch rezidivierende Sinusitis
8,1	7,1	chronisch rezidivierende Sinusitis
+ 2,3	2,8	chronisch eitrig Sinusitis
+ 8,0	8,8	chronisch eitrig Sinusitis

+ in diesen Fällen ist ein Teil des Inhibitors maskiert.

Bei chronischen Infekten ist die Konzentrationsänderung des Inhibitorgehalts vor und nach Säurebehandlung wiederum uneinheitlich. Bei einzelnen Sekreten findet eine Demaskierung von Inhibitor statt, andere bleiben unverändert, wieder andere weisen nach der Denaturierung wesentlich erniedrigte Inhibitorgehalte auf (Tab. III).

Diese Beobachtungen ließen den Schluß zu, daß neben dem niedermolekularen säurestabilen Inhibitor noch ein weiterer nicht säurestabiler Inhibitor im Nasensekret vorkommt, der in physiologischen Sekreten relativ konstant 15 % der Gesamthemmung ausmacht. In akut wie chronisch entzündlichen Sekreten wechselt der auf diesen Hemmstoff entfallende Anteil und kann bis zu 60 % betragen. Gleichzeitig an Bronchialsekreten vorgenommene Untersuchungen ließen darauf schließen, daß der im Nasensekret auf einen nicht säurestabilen Inhibitor entfallende Anteil an der Gesamthemmkapazität vom α_1 -Antitrypsin dargestellt wird. Aufgrund dieser Tatsache war es nun mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Mancini (22) möglich, die Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Proteasen noch etwas näher zu durchleuchten. Es wird zunächst festgestellt, welche antiproteolytische Aktivität im nativen Sekret vorhanden ist. Durch Bestimmung des α_1 -Antitrypsins kann die auf freien niedermolekularen Inhibitor entfallende Aktivität ermittelt werden. Nach Eiweißfällung und nochmaliger Inhibitormessung - sie ergibt den Anteil an maskiertem niedermolekularem Inhibitor - wird die Summe von maskiertem und freiem niedermolekularem Inhibitor bestimmt. Es kann dann der Prozentsatz von maskiertem Inhibitor berechnet werden, der im Sekret vorliegt (s.Tab. 4 - 8). Die Genauigkeit der Berechnungen hängt allerdings vom Prozentsatz an α_1 -Antitrypsin ab, der in maskierter Form vorliegt. Diese Größe kann weder auf rechnerischem Wege noch in unseren Messungen erfaßt werden, da α_1 -Antitrypsin weder säurestabil ist, noch durch die immunologische Methode zwischen inhibitorisch aktivem und inaktivem α_1 -Antitrypsin unterschieden werden kann.

Nach der bereits anfänglich gemachten Beobachtung, daß in den ersten drei Tagen einer akuten Infektion die Inhibitor-konzentrationen besonders niedrig liegen, wurde eine Unterteilung der bei akuten Infekten gewonnenen Sekrete vorgenommen in

1. solche aus den ersten drei Tagen der Infektion und
2. solche, jenseits der ersten Tage bis zum Abklingen der Symptomatik. Gegenübergestellt wurden diese Ergebnisse denen gesunder Kontrollpersonen sowie denen, die in den Sekreten chronisch eitrig bzw. hyperplastischer Sinusitiden gewonnen wurden. Wie Tabelle IV zeigt, wurden frühere Ergebnisse bestätigt, soweit sie den Gehalt des niedermolekularen Inhibitors betreffen. In den Sekreten gesunder Kontrollpersonen entspricht die immunologisch bestimmte Konzentration des α_1 -Antitrypsins der Differenz von 15 %, die durch Säurebehandlung der Nativekcrete zustande kommt. Damit wird die Vermutung bestätigt, daß der ausfällbare Anteil an der Hemmstoffkonzentration auf das α_1 -Antitrypsin entfällt.

Während der ersten Tage einer akuten Infektion verändert sich der absolute Gehalt an α_1 -Antitrypsin nur unwesentlich; da jedoch die Produktion des niedermolekularen Inhibitors gleichzeitig wesentlich erniedrigt ist, macht der relative Anteil des α_1 -Antitrypsins in der Gesamthemmstoffkonzentration praktisch 50 % aus. Jenseits des 3. Tages einer akuten Infektion steigt der niedermolekulare Inhibitor wieder stärker an. Damit verringert sich der relative Anteil des α_1 -Antitrypsins an der Gesamthemmung. Absolut gesehen erreicht jedoch die α_1 -Antitrypsinkonzentration im Nasensekret infolge einer erhöhten Transsudation mit 5,5 ImU/mg höhere Werte. Daraus ist zu folgern, daß dem α_1 -Antitrypsin, das im Sekret des Gesunden eine untergeordnete Rolle für die Proteasenhemmkapazität spielt, im Verlauf eitriger Infekte ein wesentlicher Anteil an der Inaktivierung leukocyitärer Proteasen zukommt. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß, wie bereits erwähnt, das immunologisch bestimmte α_1 -Antitrypsin auch inhibitorisch aktiv ist. Bei einer vergleichenden Untersuchung aliquoter Mengen α_1 -Antitrypsin aus einem Sammelsekret gesunder

Kontrollpersonen ergab sich, daß nur etwa 10 % des immunologisch bestimmten α_1 -Antitrypsins inhibitorisch aktiv sind. Allerdings ist das α_1 -Antitrypsin wesentlich weniger stabil als der niedermolekulare Inhibitor, sodaß bei der Gelfraktionierung ein Teil der inhibitorischen Aktivität verloren gegangen sein kann.

Bei chronischen Infekten der Nasenhaupt- und Nebenhöhlen ist der durchschnittliche Anteil des α_1 -Antitrypsins an der Gesamthemmung größer als bei gesunden Kontrollpersonen. Dabei scheint der Anteil bei hyperplastischen Formen etwas höher zu liegen, was jedoch in weiteren Untersuchungen überprüft werden müßte.

Tabelle IV

	1	2	3	4	5	6	7
Kontrolle	15,7	13,9	2,4	16,2	14	86	96
akut							
1. - 3. Tag	3,4	2,9	2,7	5,6	49	51	60
akut							
4. - 12. Tag	14,0	10,2	5,5	15,7	36	64	88
Chronische Infekte	9,3	7,2	3,3	10,6	32	68	88

- 1 = im Nativsekret nachweisbare freie ImU/mg Sekretprotein
- 2 = nach Denaturierung auf den säurestabilen Inhibitor entfallende ImU
- 3 = auf α_1 -Antitrypsin entfallende Inhibitorkonzentration in ImU
- 4 = Summe 2 + 3 = Gesamthemmstoffkonzentration
- 5 = % α_1 -Antitrypsin bezogen auf die Gesamthemmstoffkonzentration
- 6 = % niedermolekularer Inhibitor bezogen auf die Gesamthemmstoffkonzentration
- 7 = nicht maskiert vorliegender Prozentanteil.

Bei dieser Aufstellung wird davon ausgegangen, daß das α_1 -Antitrypsin, das immunologisch bestimmt wurde, in inhibitorisch aktiver Form vorliegt.

Tabelle V

Kontrollgruppe

1	2	3	4	5	6	7	Diagnose
19,2	17,6	1,9	19,5	10	90	8	Focussuche
13,2	11,0	2,6	13,8	20	80	96	Focussuche
12,2	11,0	2,7	13,7	18	82	89	Focussuche
12,4	11,0	1,9	12,9	15	85	96	Focussuche
21,0	19,0	2,4	21,4	11	89	98	Parotistumor
11,5	10,2	1,6	11,8	14	86	97	Otosklerose
15,4	12,8	3,2	16,0	20	80	96	Atherom
20,7	18,9	3,5	22,4	16	84	92	Höckernase
15,4	11,8	3,2	15,0	22	78	100	Chordektomie
19,6	17,2	3,0	20,2	15	85	97	Focussuche
15,7	15,0	1,4	16,4	8	92	96	Cerumen obturans
21,2	19,2	2,8	22,0	13	87	96	Ohrmuschel
13,7	12,0	1,9	13,9	7	93	98	Halszyste
11,1	10,5	0,8	11,3	7	93	98	Focussuche
12,7	11,4	1,6	13,0	12	88	97	Focussuche
16,8	15,0	2,4	17,4	14	86	96	Tonsillektomie
17,4	14,0	3,8	17,8	21	79	96	Tonsillektomie
13,8	12,4	1,9	14,3	13	87	96	Kieferschmerz

Mittelwert

15,7	13,9	2,4	16,2	14	86	96	
------	------	-----	------	----	----	----	--

Tabelle VI

Gruppe der akuten Infektionen innerhalb der ersten 3 - 4 Tage :

1	2	3	4	5	6	7	Diagnose : Rhinitis bzw. Sinusitis
0,6	1,6	1,2	2,8	43	57	22	2. Tag
2,8	2,4	2,0	4,4	46	54	64	1. Tag
4,9	4,3	2,8	7,1	40	60	69	1. Tag
4,8	5,6	4,8	10,4	46	54	47	2. Tag
4,4	2,2	4,4	6,6	67	33	67	3. Tag
1,0	0,6	1,0	1,6	63	37	63	2. Tag
0,5	0,5	1,0	1,5	67	33	30	2. Tag
5,5	1,7	4,4	6,1	72	28	90	3. Tag
3,7	2,5	1,1	3,6	31	69	100	2. Tag
4,0	4,0	2,6	6,6	39	61	60	3. Tag
1,8	2,6	1,3	3,9	33	67	46	1. Tag
3,4	4,2	3,0	7,2	42	58	47	3. Tag
5,0	4,4	5,9	10,3	57	43	49	2. Tag
5,8	4,3	2,6	6,9	38	62	84	3. Tag

Mittelwert :

3,4 2,9 2,7 5,6 49 51 60

Tabelle VII

Gruppe der akuten Infektionen jenseits der ersten 4 Tage
bis unmittelbar vor Ende der klinischen und subjektiven
Symptomatik :

1	2	3	4	5	6	7	Diagnose : Sinusitis purulenta
19,5	14,7	7,7	22,4	34	66	87	4. bis 12. Tag
12,2	10,7	3,9	14,6	27	73	84	4. bis 12. Tag
25,2	20,1	6,1	26,2	23	77	96	4. bis 12. Tag
25,2	18,0	13,2	31,2	42	58	82	4. bis 12. Tag
20,2	14,6	5,8	20,4	28	72	98	4. bis 12. Tag
15,2	11,0	5,8	16,8	35	65	90	4. bis 12. Tag
9,9	7,2	4,7	11,9	40	60	84	4. bis 12. Tag
9,1	6,1	3,9	10,0	39	61	91	4. bis 12. Tag
7,7	5,6	2,9	8,5	34	66	90	4. bis 12. Tag
10,5	6,7	4,3	11,0	39	61	95	4. bis 12. Tag
20,0	14,2	5,7	19,9	29	71	100	4. bis 12. Tag
10,2	7,4	3,8	11,2	34	66	91	4. bis 12. Tag
8,4	4,2	5,9	10,1	58	42	83	4. bis 12. Tag
11,0	8,8	3,3	12,1	27	73	91	4. bis 12. Tag
8,6	5,4	5,8	11,2	52	48	76	4. bis 12. Tag
10,2	9,3	4,5	13,8	33	67	74	4. bis 12. Tag

Mittelwert :

14,0	10,2	5,5	15,7	36	64	88
------	------	-----	------	----	----	----

Tabelle VIII

Gruppe der chronischen Infekte :

1	2	3	4	5	6	7	Diagnose
5,6	3,6	1,9	5,5	35	65	100	Chronisch rezidivierende Sinusitis
7,2	6,0	1,5	7,5	20	80	96	Polyposis nasi
9,2	5,9	3,7	9,6	39	61	96	Chronisch rezidivierende Sinusitis
15,4	9,6	5,9	15,5	38	62	99	Chronisch hyperplastische Sinusitis
8,6	6,5	1,5	8,0	19	81	100	Chronisch rezidivierende Sinusitis
23,0	17,6	6,5	24,1	27	73	95	Chronisch rezidivierende Sinusitis
4,3	2,6	2,0	4,6	43	57	93	Chronisch rezidivierende Sinusitis
6,4	5,3	2,7	8,0	34	66	80	Chronisch rezidivierende Sinusitis
12,4	9,5	6,5	16,0	41	59	78	Chronisch rezidivierende Sinusitis
6,1	5,2	1,2	6,4	19	81	95	Chronisch rezidivierende Sinusitis
7,2	5,1	5,0	10,1	50	50	72	Chronisch rezidivierende Sinusitis
14,2	10,5	3,7	14,2	26	74	100	Chronisch hyperplastische Sinusitis
8,0	8,8	2,3	11,1	21	79	72	Chronisch rezidivierende Sinusitis
13,2	9,7	3,4	13,1	26	74	100	Chronisch rezidivierende Sinusitis
10,4	8,8	2,4	11,2	21	79	92	Chronisch rezidivierende Sinusitis
8,1	7,1	2,8	9,9	28	72	82	Chronisch rezidivierende Sinusitis
4,9	4,9	1,7	6,6	26	74	74	Chronisch rezidivierende Sinusitis
5,8	5,8	2,3	8,1	28	72	72	Chronisch rezidivierende Sinusitis
6,5	4,0	3,2	7,2	44	56	91	Chronisch rezidivierende Sinusitis
9,6	8,0	6,4	14,4	45	55	67	Poliposis nasi

Mittelwert :

9,3 7,2 3,3 10,6 32 68 88

Nach den vorherigen Untersuchungen erschien es interessant, im Verlauf eitriger Sinitiden den niedermolekularen Inhibitorgehalt und gleichzeitig die α_1 -Antitrypsinkonzentration in Nasensekreten zu bestimmen. Wie die Abbildungen 2 und 3 zeigen, werden die vorherigen Untersuchungen bestätigt, nach denen der absolute Anteil des α_1 -Antitrypsins im Verlauf akuter eitriger Infekte zunimmt und mit der Ausheilung auf das physiologische Niveau abfällt. Der niedermolekulare Inhibitorgehalt verändert sich in der typischen bereits geschilderten Weise.

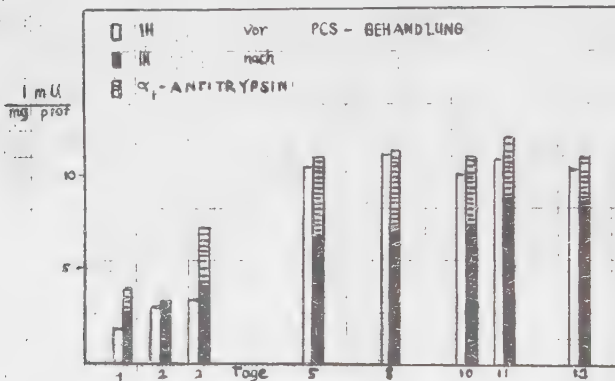


Abb. 2

Die weißen Säulen stellen die gesamte frei vorliegende Nukleinstoffkonzentration im Nasensekret dar, wobei diese als Summe des frei vorliegenden niedermolekularen Inhibitors sowie des frei vorliegenden, d.h. nicht an leukozytäre Proteasen gebundenen α_1 -Antitrypsins aufzufassen ist. Die schraffierten Säulen stellen die Konzentration des im Sekret insgesamt vorliegenden niedermolekularen Inhibitors an, zu dem die Menge des immunologisch bestimmten, -schraffiert dargestellten, - α_1 -Antitrypsins addiert ist. Die Differenz zwischen diesen beiden Werten stellt das immunologisch bestimmte α_1 -Antitrypsin dar.

aktiv ist. Die Differenz der Säulen 1 und 2 gibt den Teil der Gesamthermstoffkonzentration an, der durch Bindung an leukozytäre Proteasen maskiert ist, d.h. dem direkten Nachweis im Nativsekret entzogen ist. Ob beide Inhibitoren zu gleichen Teilen maskiert sind, oder ob die Maskierung überwiegend den niedermolekularen Inhibitor betrifft, sodaß das α_1 -Antitrypsin im Nativsekret nicht an Proteasen gebunden ist, läßt sich bisher nicht beantworten.

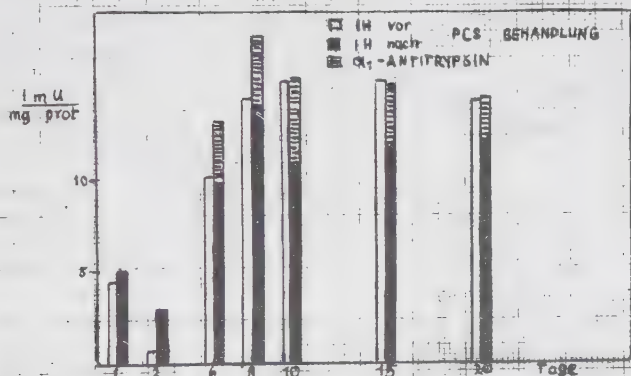


Abb. 3

Zusammenfassend kann man also vorerst folgendes feststellen : im Verlauf einer Rhinitis kommt es parallel mit den subjektiven Beschwerden zu einem Abfall des Inhibitorgehaltes des Nasensekrets, in schweren Fällen sogar zum völligen Verschwinden des Inhibitors mit Auftreten von proteolytischer Aktivität. Im Verlauf der Ausheilung pendelt sich der Hemmstoffgehalt nach anfänglicher Überkompensation auf den individuellen, physiologischen Wert ein, eine Erscheinung, die wir ebenfalls auf den vermehrten Anfall von zerfallenden Leukozyten zurückführen. Ausgehend von diesen Beobachtungen, die zwar

für klinische Untersuchungen genügend aussagekräftig, jedoch nicht ganz exakt sind, da vorausgesetzt wird, daß die gesamte Menge des immunologisch bestimmten α_1 -Antitrypsins in freier, inhibitorisch aktiver Form vorliegt, versuchten wir, auch noch den Nachweis für die Wechselwirkung bzw. für das Produkt dieser Wechselwirkung zwischen Proteasen und α_1 -Antitrypsin im Respirationstrakt zu führen. Daß die Schwierigkeit des Unternehmens darin lag, daß α_1 -Antitrypsin zum einen nicht säurestabil ist und zum andern sowohl inhibitorisch aktives wie maskiertes α_1 -Antitrypsin bei der Methode nach Mancini mit dem entsprechenden Antiserum reagiert, wurde bereits gesagt. Es war also nicht ohne weiteres möglich, den Anteil von proteasengebundenem α_1 -Antitrypsin neben freiem α_1 -Antitrypsin zu bestimmen.

Bei der immunoelektrophoretischen Identifizierung des hochmolekularen Inhibitors im Nasen- und Bronchialsekret als α_1 -Antitrypsin fiel aber auf, daß häufig der Präcipitationsbogen für α_1 -Antitrypsin in Richtung der Kathode verlängert ist. In günstigen Fällen (s. Abb.4) ist eine zweite ausgeprägte Präcipitationslinie zu erkennen. Um eine Schwansbildung durch Adsorption des Antigens an saure Lucopolysaccharide kann es sich deshalb nicht handeln. Die Bilder zeigen Ähnlichkeit mit Bildern, die von Heinburger (23) nach Mischen von Humanserum mit Trypsin oder Plasmin und nachfolgender immun-

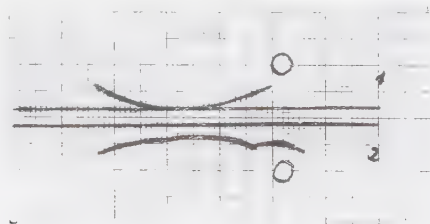


Abb. 4

Immunoelektrophorese von Bronchialsekret (2) und Antiserum (1).
Anti- α_1 -Antitrypsin.

elektrophoretischer Analyse mit Anti- α_1 -Antitrypsinserum erhalten werde. Es ist daher anzunehmen, daß der zweite in unseren Sekreten auftretende Präcipitationsbogen von einer Komplexverbindung zwischen α_1 -Antitrypsin und leukocytären Proteasen hervorgerufen wird. Bei dieser Art der Untersuchung sind jedoch nur unter erheblichem Aufwand quantitative Aussagen über die Menge an gebundenem und freiem α_1 -Antitrypsin in einem Sekret zu erhalten. Wichtig war jedoch die Beobachtung, daß offensichtlich mit Hilfe der Immunelektrophorese eine Differenzierungsmöglichkeit gegeben ist: komplex gebundenes α_1 -Antitrypsin besitzt eine andere elektrophoretische Beweglichkeit wie der freie Hemmstoff und reagiert auch mit demselben monovalenten Antiserum wie das freie α_1 -Antitrypsin. Als brauchbarer Weg, um zu quantitativen Aussagen zu kommen, erschien uns die Anwendung der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell (24). Bereits Ohlsson (25,26) konnte mit Hilfe dieses Verfahrens Komplexverbindungen zwischen α_1 -Antitrypsin und Leukocytenproteasen im Serum nach Mischen mit Leukocytenproteasen nachweisen. Wir stellten jedoch fest, daß die Komplexverbindung bei der üblichen Technik eine zu geringe anodische Wanderungsgeschwindigkeit besitzt. Dies bewirkt eine niedrige Gipfelhöhe. Wir verwendeten deshalb die von Stephan und Frahm (27) modifizierte Laurell-Elektrophoresemethode. Die Verbesserung dieses Verfahrens besteht darin, daß durch Umsetzen der Proteine mit β -Propiolacton die negative Ladung und damit die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine erhöht wird. Die immunologischen Eigenschaften bleiben erhalten. Bei Anwendung dieser Technik auf Serum ergeben sich keine besonderen Schwierigkeiten, da bei der Menge des zur Verfügung stehenden Materials die Modifizierung leicht im Autotitrator durchgeführt werden kann. Bei der Untersuchung von Sekreten, die nur in geringer Menge (z.B. Cervixschleim, Bronchialsekret) oder mit niedrigem Gehalt an Serumproteinen (z.B. Nasensekret, Liquor) erhalten werden, sind einige technische Veränderungen nötig. So wird die Modifizierung nicht im Autotitrator durchgeführt, sondern die Sekrete werden in Puffer aufgenommen, der die bei der Umsetzung mit β -Propiolacton freiwerdende Acidität abfängt. Schließlich

verschafft man sich durch vorherige Bestimmung des Proteingehaltes einen Überblick über die zu erwartende Proteinmenge. Mittels Druckdialyse bis zur Trockne werden die überschüssigen Reagenzien entfernt und der Rückstand in einer geeigneten Menge Elektrophoresepuffer aufgelöst. Zur elektrophoretischen Auftrennung gelangen 100 - 500 μ g Sekretprotein, die eine gut nachweisbare Menge von α_1 -Antitrypsin enthalten (s.auch : experimenteller Teil). Bei den Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß durch die Manipulation mit β -Propiolacton keine Veränderung des Verhältnisses von freiem und maskiertem α_1 -Antitrypsin in den Nativsekreten hervorgerufen wird. α_1 -Antitrypsin ist zwar ein sogenannter Lysininhibitor, d.h. sein reaktives Zentrum wird von einem Lysinrest (23) repräsentiert. Acylierung mit Blockierung aller α - und ϵ -Aminogruppen führt daher zum Verlust der Hemmwirkung und der Komplexbildungsfähigkeit mit Proteasen. Durch den im Nativsekret vorliegenden Komplex mit Proteasen ist jedoch bereits das aktive Zentrum des Inhibitors - wahrscheinlich in Form einer Acylverbindung - maskiert und vor Acylierung geschützt. Die Bildung einer zweiten Präcipitationslinie bei komplexhaltigen Sekreten wird durch Acylierung ebenfalls nicht verhindert. Die folgenden Darstellungen zeigen Bilder, wie man sie erhält, wenn man α_1 -Antitrypsin

1. in einem normalen Serum (Abb.5)
2. nach Mischen von Serum mit Trypsin oder leukocytären Proteasen (Abb.6)
3. im Bronchialsekret (Abb.7)
4. im Liquor mit Leukocytose (Abb.8)

mit Hilfe der zweidimensionalen Immunelektrophorese nachweist. Wie man sieht, erscheint bei Anwesenheit von komplex gebundenem α_1 -Antitrypsin bei diesem Verfahren mit monovalentem Antiserum gegen α_1 -Antitrypsin ein weiterer Präcipitationsgipfel, der in Richtung Kathode verschoben ist und dem Inhibitor - Proteasekomplex entspricht.

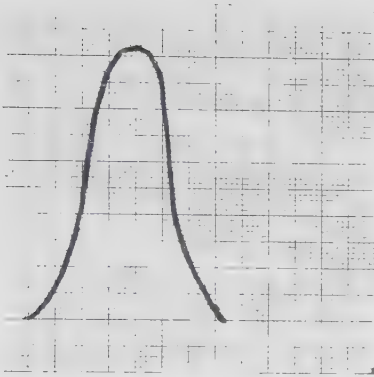


Abb. 5

α_1 -Antitrypsin im
Humanserum

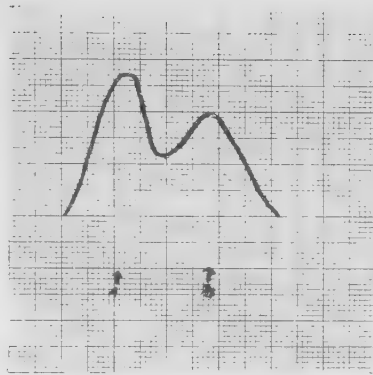


Abb. 6

Zweidimensionale Immunelektrophorese
einer Mischung von α_1 -Antitrypsin u.
Trypsin

- 1 = freies α_1 -Antitrypsin
- 2 = Enzyminhibitor-komplex

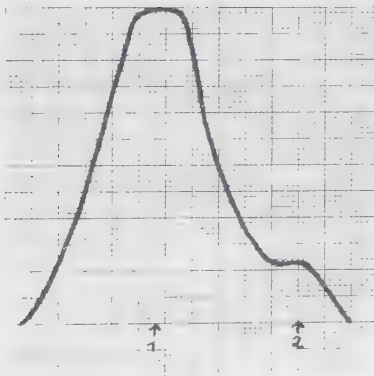


Abb. 7

Zweidimensionale Immun-
elektrophorese von
Bronchialsekret

- 1 = freies α_1 -Antitrypsin
- 2 = Komplex mit Leukocy-
tenproteasen

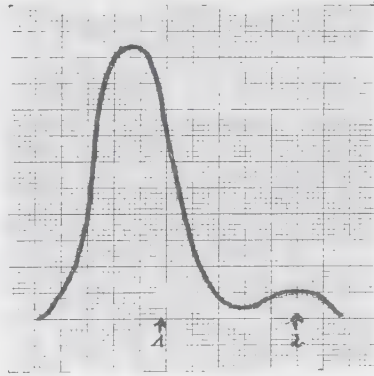


Abb. 8

Zweidimensionale Immunelektrophorese
von Liquor mit Leukocytose

- 1 = freies α_1 -Antitrypsin
- 2 = Komplex mit Leukocytenproteasen

Um zu prüfen, inwieweit die Flächen der Gipfel als Maß für die Menge an gebundenem α_1 -Antitrypsin verwendet werden können, gingen wir wie folgt vor :

Reines α_1 -Antitrypsin wurde in Modifizierungspuffer gelöst und zunächst die Gesamthemmkapazität gegen Trypsin bestimmt. Anschließend wurden Proben mit konstantem α_1 -Antitrypsingehalt mit steigenden Mengen Trypsin versetzt, die verbleibende Hemmstoffmenge bestimmt, die Proben modifiziert und der Immunelektrophorese unterworfen. Für jeden Ansatz erhält man ein definiertes Verhältnis der Prozentanteile der Flächen, die auf freien und gebundenen Inhibitor entfallen (s. Tab. IX). Bei der graphischen Darstellung der Abhängigkeit des auf freien Inhibitor entfallenden Flächenanteils von der verbleibenden Restaktivität erhält man eine Kurve mit einem Verlauf, der analog ist zu Hemmkurven, wie sie mit kinetischen Hemmtests erhalten werden (s. Abb. 9). Wie die Abbildung weiter zeigt, verbleibt auch bei völliger Inaktivierung von α_1 -Antitrypsin mit Trypsin eine Restfläche, die auf nicht komplexgebundenes α_1 -Antitrypsin entfällt. Dies könnte ein Hinweis sein, daß α_1 -Antitrypsin auch in einer zwar immunologisch intakten, aber inhibitorisch inaktiven Form vorkommen kann. Die mit Trypsin - α_1 -Antitrypsinkomplexen erhaltene Eichkurve ist direkt zur Bestimmung des an Leukocytenproteasen gebundenen α_1 -Antitrypsins in Sekreten und Körperflüssigkeiten verwendbar. Nach Versetzen von α_1 -Antitrypsin mit steigender Menge von Leukocytenproteasen wird die gleiche Abhängigkeit der Flächenprozentanteile von der verbleibenden Resthemmkapazität erhalten.

Tabelle IX

Anteile von freiem und gebundenem α_1 -Antitrypsin bei Versetzen von Proben gleichen α_1 -Antitrypsingehaltes mit steigenden Mengen von Trypsin.

ImU/mg	α_1 frei(%)	α_1 geb.(%)	α_1 frei(Fläche%)	α_1 geb.(Fläche%)
1.250	100	0	100	0
910	73	27	97,5	2,5
850	68	32	97,3	2,7
662	53	47	94	6
625	50	50	90	10
450	36	64	82,5	17,5
415	33	67	76	24
337	28	74	75	25
250	17	83	54	46
125	5	95	20	80

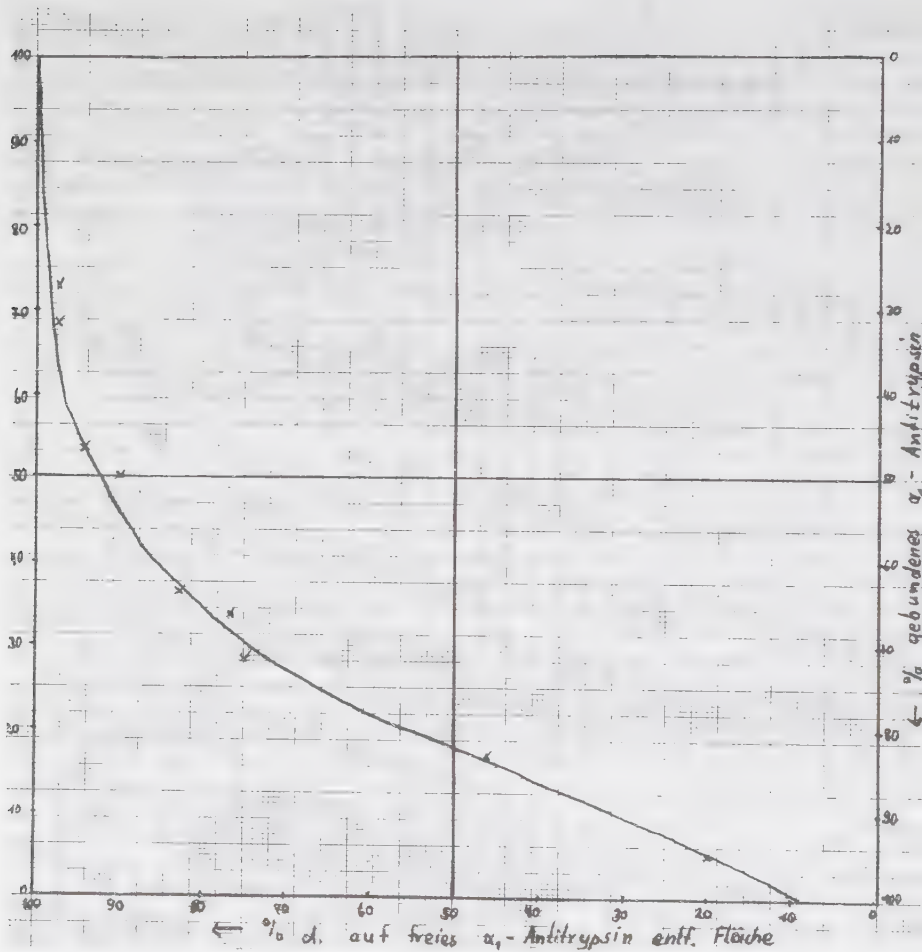


Abb. 9

Abhängigkeit der auf freies α_1 -Antitrypsin entfallenden Fläche (in % der Gesamtfläche Abszisse) von der verbleibenden Restaktivität bei Zusatz von steigenden Trypsinmengen (Ordinate).

IV. Experimenteller Teil.

1. Methoden.

Die zur Ermittlung der Untersuchungsergebnisse angewandten Verfahren lassen sich den zu Grunde liegenden Prinzipien zufolge in zwei Gruppen einteilen : in photometrische und in immunologische Methoden.

Was die optischen Messungen betrifft, die zur Bestimmung der Protein- und Inhibitorkonzentration in den Sekreten benutzt wurden, so sind diese mit Hilfe eines Photometers und des Lambert - Beer'schen Gesetzes

$$A = E = \epsilon c$$

durchführbar. Mißt man hierbei die Extinktion für Lösungen, deren Konzentrationen bekannt sind, so ist es möglich, für eine bestimmte Substanz den molaren Extinktionskoeffizienten zu ermitteln und mit dessen Hilfe eine Eichkurve aufzustellen. Aus dieser lassen sich dann entsprechend der jeweils gemessenen Extinktion die Konzentrationen der in Frage kommenden Substanz in verschiedenen Probelösungen ablesen. Für die Bestimmung der Eiweißkonzentration mit Hilfe dieses Prinzips bedienen wir uns der Winhydrinreaktion. Während es bei der Bestimmung der Proteinkonzentration darum geht, die Extinktion einer bestimmten Probe im Vergleich zu der einer Eichlösung festzustellen, erfolgt die quantitative Erfassung eines Enzyms dadurch, daß man die Änderungsgeschwindigkeit der Extinktion im Verlauf einer vom Enzym katalysierten Farbreaktion erfaßt. In diesem Falle muß dann das Lambert-Beer'sche Gesetz lauten :

$$AE = \epsilon c$$

vorausgesetzt, daß man sich mit den für die Reaktionspartner gewählten Konzentrationen in einem Bereich bewegt, innerhalb dessen sich die Reaktionsgeschwindigkeit in linearer Abhängigkeit von der Enzymkonzentration anzeigt.

Bei den vorliegenden Untersuchungen im Pankreassekret ging es jedoch in erster Linie nicht um die quantitative Erfassung eines Enzyms, sondern um die eines Enzyminhibitors, der Trypsin im Verhältnis 1 : 1 hemmt, d.h. mit anderen Worten : 1 ImU $\hat{=}$ 1 μ g Trypsin. Damit wird nun eine Inhibitorbestimmung folgendermaßen möglich : im Verlaufe einer von Trypsin katalysierten Reaktion bestimmt man die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit zunächst für einen Ansatz mit einer definierten Menge Trypsin und sodann für einen Ansatz, der dieselbe Menge Trypsin neben inhibitorhaltigem Sekret enthält. Die Differenz zwischen den beiden Werten erlaubt es, die Menge des durch Inhibitor inaktivierten Trypsins zu berechnen und über die Beziehung : 1 ImU $\hat{=}$ 1 μ g Trypsin auch die vorhandenen Inhibitoreinheiten zu bestimmen.

Inhibitoreinheiten sind aber nun nicht nur mit Hilfe dieses optischen Verfahrens nachweisbar, sondern auch - und damit ist nun die zweite Gruppe der angewandten Methoden angesprochen - durch immunologische Methoden, d.h. mit Methoden, die auf der Reaktion von Antigen und Antikörper beruhen. Letzteres ist auch beim Verfahren nach Mancini (22) der Fall, das im Verlauf dieser Arbeit zur Bestimmung von α_1 -Antitrypsin verwendet wurde. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß gelöste Antigenmoleküle radial von einem zylinderförmigen Startloch in eine gleichmäßig dicke, das homologe Antiserum enthaltende Agarschicht diffundieren und dabei einen Präzipitatring ausbilden (s. Abb. 10). Der zu messende Radius bzw. Durchmesser dieses Präzipitatkreises ist eine Funktion der aufgetragenen Antigenmenge. Füllt man bei allen Standard- und Analysenproben genau gleiche Volumina der Antigenlösung in die Startlöcher, so erhält man über eine mit Hilfe standardisierter Proteinpräparate aufstellbare Bezugskurve (s. Abb. 11) die Antigenkonzentration einer Analysenlösung.

Eine weitere Möglichkeit, zu einer Differenzierung und Mengenbestimmung von Proteinen zu kommen, ist die Kombination von Immunpräzipitation und elektrischem Feld. Ausgangspunkt für diese Methode war die freie Elektrophorese von Tiselius. Dieses Verfahren wurde dann von Bussard, Perrin und Gordon durch die Verwendung von Gelen als Trägermilieu fortentwickelt. Den physikalischen Vorgang der Wanderung eines Gemischs elektrisch geladener Partikel im Gleichstromfeld mit dem biologischen Vorgang der Präzipitation bei Antigen-Antikörper-Reaktion zu verbinden, war schließlich die Idee von Graber und Williams. Ihre Methode ermöglicht die qualitative Bestimmung von Proteinen, den Nachweis abartiger Eiweißkörper innerhalb einer biologischen Flüssigkeit und die Aufdeckung von Antigen - verwandtschaften bei zwei verschiedenen Antigenen, d.h. des Besitzes gemeinsamer Antigendeterminanten. Eine quantitative Erfassung von Serumprotein, wie sie bei unseren Untersuchungen notwendig war, wurde dann von Laurell (24) und in Modifizierung von Stephan und Frahm (27) beschrieben. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die Proteine des Untersuchungsmaterials in einem Trägermilieu unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. An diese erste Transportphase schließt sich eine zweite an, in der der Transport der Proteine senkrecht zur Wanderungsrichtung der ersten Phase in ein antikörperhaltiges Gel erfolgt. Damit beginnt gleichzeitig die Phase der Präzipitation, an deren Ende sich eine Präzipitationslinie, wie sie in Abb. 5 gezeichnet ist, darstellt. Die von der Präzipitationslinie umschlossene Fläche ist ein Maß für die vorhandene Menge an Protein, die nun durch Vergleich mit Gipfflächen, die von Proben bekannten Protein - gehalts gebildet werden, berechnet werden kann.

2. Inverser Nasengang .

a) Materialgewinnung :

Nasensekret wurde ambulanten Patienten der Klinik entnommen. Man führte ihnen mit physiologischer NaCl - Lösung getränkte Baumwolltampons 15 Minuten lang in die unteren Nasengänge ein. Die Tampons wurden mit 0,4 M Triäthylamin / HCl-Puffer (pH 8,1) extrahiert und der Extrakt filtriert. Bronchialsekret kann bei tracheotomierten, laryngektomierten oder intubierten Patienten durch Absaugen gewonnen werden. Liquor erhält man durch entsprechende Funktion.

α_1 -Antitrypsin bzw. Trypsin (TPCK - behandelte) wurde von den Behringwerken bezogen. Die verwendeten Leukocytenproteasen waren ein Laborpräparat.

b) Proteinbestimmung :

0,05 ml Sekreteluat werden in Reagenzgläser pipettiert, 1,0 ml 2,5 n NaOH zugegeben und 60 Minuten im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Danach setzt man 1,0 ml 30 % Essigsäure und 2 ml Ninhydrinreagens zu (8 g Ninhydrin in 200 ml 4 n Na-acetatpuffer, pH - 5,5 und 50 mg SnCl_2). Anschließend wird die Probe wieder 30 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt und dann mit 5 ml Propanol-Wasser (1 : 1) verdünnt. Im Photometer bestimmt man schließlich die Extinktion bei 578 nm gegen Wasser und entnimmt aus einer vorher aufgestellten Eichkurve die zugehörigen Proteinwerte (Eichkurve wurde in gleicher Weise mit Eichlösungen, die 50, 100 und 200 μg Protein enthielten, gewonnen).

c) Bestimmung der Enzymhemmung :

Die Hemmwirkung der Sekrete wurde anhand der Verminderung der Hydrolysegeschwindigkeit von N- α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPn) durch Trypsin bestimmt. Der Inhibitorgehalt des Sekrets wird in ImU (Inhibitor-Milliunits) pro μg Eiweiß angegeben, wobei 1 ImU die Aktivität von 1 μg Trypsin gegen BAPn aufhebt (1 : 1) .

Inkubationsansatz : In Cuvetten ($d = 1,0 \text{ cm}$) $10 \mu\text{g}$ Trypsin gelöst in $0,2 \text{ ml}$ $0,0025 \text{ M HCl}$; $0,2 \text{ ml}$ inhibitorhaltiges Blut; Puffer : pH 7,8 , $0,2 \text{ M}$ Triäthanolamin, enthaltend 20 mM CaCl_2 ; Endvolumen : 2 ml ; 5 Minuten bei 25° C vorinkubieren und dann 1 ml Substrat (BAPA) zugeben. Extinktionszunahme pro Minute bei 405 nm bestimmen. Die Verminderung der Extinktionszunahme gegenüber dem Trypsinleerwert (= Spaltansatz ohne Sekret) gibt den Inhibitorgehalt an. Eine ImU ist vorhanden, wenn die Extinktionszunahme um $0,0033$ Einheiten vermindert wird. Exakte Bestimmung des Hemmstoffgehaltes ist allerdings nur bis zu einer 50% Hemmung durchführbar, da darüberhinaus die Linearität der Hemmkurve nicht mehr gegeben ist.

- d) Denaturierende Säurebehandlung zum Nachweis maskierten Inhibitors :

Die Enteiweißung der Proben zur Bestimmung etwa vorliegender, maskierter antiproteolytischer Wirkung erfolgt durch Mischen der Sekretproben mit 5% Perchlorsäure im Verhältnis $1 : 1$. Nach Zentrifugieren und Dekantieren wird der Überstand mit 20% NaOH neutralisiert und erneut die Hemmwirkung wie unter c) angegeben, geprüft.

- e) Modifizierungsreaktion:

Nach Bestimmung des Protein- und Hemmstoffgehalts werden nun pro ml Probenmaterial $8 \mu\text{l}$ Propiolacton zugegeben und 2 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wird durch Druckdialyse (Sartorius-Dialysierhülsen) eine definierte Sekretmenge bis zur Trockne eingeengt. Für den Mancini-test wird der Rückstand in $0,1 \text{ ml}$ $0,1 \text{ M}$ Boratpuffer aufgenommen, für die Elektrophorese wird die eingetrocknete Probe in soviel Elektrophoresepuffer gelöst, daß $3 \mu\text{l}$ etwa $100 - 500 \mu\text{g}$ Protein enthalten.

f) Mancini - Test zur Bestimmung der auf α_1 -Antitrypsin entfallenden Immunität :

Für diese Untersuchung verwendet man am besten handelsübliche, gebrauchsfertige Partigen - Immendiffusionsplatten (Behringwerke, s. Abb. 10). Die in die anti-serumhaltige Agargelschicht gestanzten Löcher füllt man mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) mit 2 μ l Antigenlösung, d.h. in unserem Fall mit 2 μ l derjenigen Lösung, die man nach Linierung des Untersuchungsmaterials bis zur Trockne und Versetzen des Rückstands mit 0,1 M Boratpuffer erhält. Während man aufträgt, muß die Platte völlig eben liegen. Mindestens drei der Startlöcher werden benötigt, um mittels verschiedener Verdünnungen eines Standards eine Bezugskurve anzulegen. Die übrigen Auftragstellen stehen für die zu untersuchenden Lösungen zur Verfügung. Als Standardlösung verwendet man Humanserum (Behringwerke), das mit physiologischer Kochsalzlösung auf folgende Weise verdünnt wird : Humanserum / NaCl wie 1 : 7, 1 : 3, 1 : 2 (Verdünnung 1 : 1 bedeutet unverdünnt, 1 : 2 auf das Doppelte verdünnt, usw.). Nach dem Einfüllen bleiben die Platten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer stehen. Meist läßt sich schon nach einem Tag eine ungefähre Ablesung durchführen. Am besten erfolgt die Auswertung aber erst nach zwei Tagen, da sich die kreisförmigen Immunpräzipitate dann so deutlich in der Gelschicht abgebildet haben, daß sie mit Hilfe einer Meßschablone gut ausgemessen werden können. Zur Aufstellung einer Bezugskurve (s. Abb. 11) ermittelt man zunächst die Durchmesser der Präzipitaringe, die sich mit den Standardlösungen entwickelt haben. Diese werden dann quadriert und auf linearem Millimeterpapier in Abhängigkeit von den Proteinkonzentrationen aufgetragen. Schließlich werden auch die Durchmesser des Immunpräzipitates, die sich um die Auftragstellen der Untersuchungsproben gebildet haben, ausgemessen. Zu den erhaltenen Werte werden die zugehörigen Proteinkonzentrationen auf der Bezugskurve abgelesen. Nach Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor

ergibt sich unter Berücksichtigung der durchgeführten Druckfiltration der gesuchte Gehalt des α_1 -Antitrypsins bezogen auf die Volumeneinheit der unverdünnten Untersuchungssprobe. Mit Hilfe der bereits ermittelten Proteinkonzentration läßt sich jetzt der Gehalt an α_1 -Antitrypsin bezogen auf mg Sekretprotein errechnen. Zur Umrechnung des α_1 -Antitrypsingehaltes in ImU gilt folgende Beziehung :

$$\text{spezifische Aktivität} = \text{ImU} / \mu\text{g Protein} =$$

$$\frac{\text{mgW - Trypsin}}{\text{mgW - } \alpha_1\text{-AT}} = \frac{24000}{53000} = 0,53$$

d.h. 1 μg α_1 -Antitrypsin hemmt 0,53 μg Trypsin bzw. 1 μg α_1 -Antitrypsin repräsentiert 0,53 ImU gegen Trypsin. Der Gehalt an α_1 -Antitrypsin, ausgedrückt in ImU, wird auf das sezernierte Protein bezogen.

- g) Nachweis von komplexgebundenem α_1 -Antitrypsin durch quantitative simultane Immunelektrophorese (28) :
Durchführung der Elektrophorese :

Die quantitative simultan-Immunelektrophorese führt man auf Diapositivgläsern (5 x 5) durch. Zur Reinigung werden diese zunächst in Dichromatschwefelsäure gestellt und anschließend mit Wasser und aqua dest. abgespült. Dann werden sie in Athanol absolut gelegt und schließlich mit dem Föhn getrocknet. Bevor man das Trägermilieu aufträgt, empfiehlt es sich noch, die Kanten der Gläser mit Agarose - Lösung vorzustreichen, um später ein besseres Anhaften des Gels zu gewährleisten. Zur Herstellung des Trägermilieus werden 1 g Agarose, 0,05 g Na-azid und 50 ml aqua dest. in einen Erlenmeyerkolben gegeben und im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann pipettiert man von dieser Geüllösung für jedes Diapositivglas 2 ml in ein Reagenzglas und gibt 2 ml des Elektrophoresepuffers dazu. Nach gründlicher Durchmischung wird die Lösung auf die absolut waagrecht (nivelliertisch !) liegenden Diapositivgläser gegossen. Wenn das Gel erstarrt ist, kann man mit dem Stanzgerät das Startloch für das

Untersuchungsmaterial markieren und mittels einer Wasserstrahlpumpe aus eben (s. Abb. 12). Das im Erlermeyer - kolben verbliebene Restgel pipettiert man am besten in Volumina von 2 ml und 1,4 ml in Reagenzgläser und bewahrt es bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank auf. Nun werden die einzelnen Substanzen mit Hilfe einer Hamilton - Spritze in die Startlöcher gefüllt. Für die anschließende Elektrophorese verwendet man den von Stephan und Frahm angegebenen Puffer. Dieser Puffer hat eine Molarität von 0,075 und einen pH - Wert von 8,6. Für den Lauf in der Kammer wird er mit aqua dest. 1 : 2 verdünnt, sodaß die Molarität auf 0,0375 sinkt. Die Zusammensetzung ist folgende:

Na-Barbiturat 77 g; Barbitursäure 13,8 g; Ca-lactat 3,85 g; Na-azid 1 g. Das Volumen wird mit aqua dest. auf 5 l gebracht. Die bei der Elektrophorese gewählte Spannung beträgt 170 V, die Dauer 2 - 3 Std. Geht die elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine ihrer Ende entgegen, so heizt man ein Wasserbad auf 56 ° C auf und erwärmt darin für jedes Diapositivglas ein Reagenzglas mit 1,4 ml des Elektrophoresepuffers. Zudem verflüssigt man - ebenfalls pro Diapositivglas - 1,4 ml der früher bereiteter Agaroselösung im siedenden Wasserbad und temperiert diese Lösung dann wie den Puffer auf 56 ° C. Unmittelbar bevor die Diapositivgläser für den zweiten Lauf in der Elektrophoresekammer präpariert werden, pipettiert man zum Puffer Anti- α_1 -Antitrypsin von Kaninchen (Behringwerke), schüttet das Gel hinzu und durchmischt die Flüssigkeiten gründlich. Die Präparation der Diapositivgläser für den zweiten Lauf geht folgendermaßen vor sich (s. Abb. 13) :

Die zur elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine benutzte Agaroseschicht wird bis auf den Rest, der die aufgetrennten Proteine enthält, entfernt. Dann dreht man die Platten um 90° und gießt die vorher bereitete anti-körperhaltige Agaroselösung vorsichtig an das verbliebene Restgel an. Beim Angießen ist wiederum darauf zu achten, daß die Platten absolut waagrecht liegen. Ist das ange-gossene Gel erstarrt, kann man die Platten wieder in die Elektrophoresekammer einlegen und die zweite Phase der

Wanderung einleiten (Polung !). Zur guten Darstellung von freiem und gebundenem α_1 -Antitrypsin ist die von Stephan und Frahm für die Darstellung der Serumproteine angegebene Antiserumkonzentration im Präcipitationsgel zu hoch. Es kommt zur vorzeitigen Präcipitation der Antigene, wenn monovalentes Antiserum verwendet wird. Wir setzten nur ein Drittel der Menge an Antiserum ein und erhielten dadurch höhere und besser auswertbare Gipfel. Die fertigen Präparate werden zunächst 24 Stunden lang ausgewaschen und zwar in einer Kammer, die auf einen Magnetrührer gestellt und mit physiol. NaCl und etwas Na-azid (0,1 %) beschickt wird. Danach kann man die Platten aus der Waschflüssigkeit nehmen, mit einem angefeuchteten Filterpapier abdecken und mit einem Föhn trocknen. Anfärbung (Fixierung in Essigsäure, Färben mit Azokarmin, Entfärben mit Elphor - Entfärber) und Ermittlung der Gipfelflächen nach photographischer Vergrößerung bilden den Abschluß des Verfahrens.

Aufstellen einer Dose kurve :

Von einer wässrigen Stammlösung von α_1 -Antitrypsin, die $2500 \frac{\text{ImU}}{\text{ml}}$ enthält, werden Proben von 0,5 ml (= 1250 ImU) entnommen, mit 1 ml Triäthanolamin / HCL-Puffer (0,4 l; pH 8,1) vermischt und jeweils etwa 200, 300, 400, 500, 600 μg Trypsin zugegeben. Nach Bestimmung der Restaktivität wird mit Tropiolacton umgesetzt und wie unter e) beschrieben weiterverarbeitet. Die trockenen Rückstände der Proben werden in 0,2 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer gelöst und 3 μl zur zweidimensionalen Elektrophorese verwendet. Die Gipfelflächen werden zu den Prozentzahlen des gebundenen α_1 -Antitrypsins in Beziehung gesetzt.

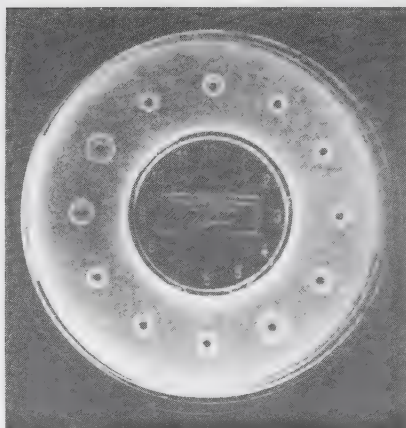
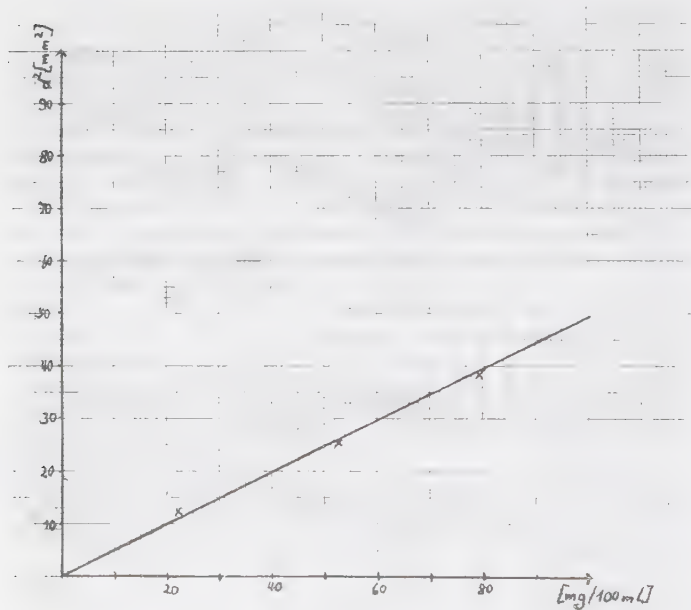


Abb. 10

Antiserum-Agargel-Immunelectrophoresisplatte zur Bestimmung von α_1 -Antitrypsin



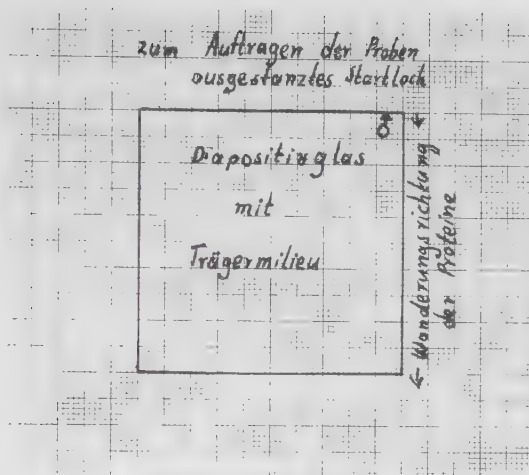


Abb. 12

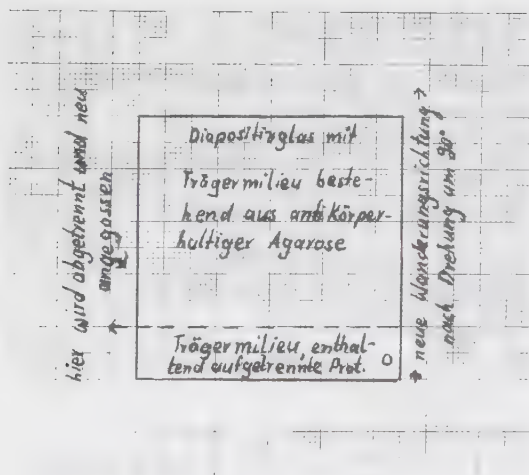


Abb. 13

V. Diskussion . =====

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die in der Einleitung aufgestellte Hypothese über die Stellung der Proteaseninhibitoren im Infektabwehrsystem der Schleimhäute der oberen Luftwege. Danach übernimmt das inhibitorische System die Aufgabe, die beim Zerfall der in das Sekret übergetretenen Leukocyten freiwerdenden Proteasen, die zu den stärksten Entzündungsmediatoren gehören (21,30), abzufangen. Gestützt wird diese Hypothese durch verschiedene Beobachtungen, die als sozusagen indirekter Beweis für die Funktion des hemmenden Systems aufzufassen sind.

Zu diesen Beobachtungen gehört der Befund, daß Elastase (31), die in Leukocyten vorkommt und infolge ihrer Spezifität die Dehnbarkeit der Lungenalveolen verändert, durch α_1 -Antitrypsin gehemmt werden kann ebenso, wie die Tatsache, daß α_1 -Antitrypsin die Wirkung von Subtilisin, einer Bakterienprotease und Fronsase, einer Pilzprotease, aufzuheben vermag. Außerdem weiß man, daß auch Kallikrein, das als Kinin liberierende Protease bronchokonstriktorisch wirkt, von α_1 -Antitrypsin inhibiert wird.

Bei erblichem Mangel von α_1 -Antitrypsin, dem auch in den Lungenalveolen wirksamen Proteasenhemmstoff, werden in gesteigertem Maße Lungenemphyseme beobachtet (32 - 40). Die Entstehung dieser Emphyseme wird auf gesteigerte proteolytische Aktivität in den Alveolen als Folge des ausfallenden inhibierenden Systems zurückgeführt. Nicht nur das Fehlen, sondern auch eine individuelle Erniedrigung des α_1 -Antitrypsinspiegels im Serum wurde in Zusammenhang mit erhöhter Anfälligkeit gegenüber pulmonalen und bronchialen Infekten und degenerativen Prozessen gebracht. Wie die Erniedrigung des Inhibitorspiegels einerseits, so kann offenbar auch die vermehrte Belastung des Inhibitorpools andererseits in verstärktem Maße zu Komplikationen führen. So beobachtet man vor allem bei Arbeitern der Detergentienindustrie, die proteasehaltigen Staub inhalieren, bronchopulmonale Affektionen.

Am Tier können durch Pepsin und andere pflanzliche Proteasen, die durch Seruminhibitoren nicht gehemmt werden, Lungenemphysemen und Bronchiektasien erzeugt werden (41,42).

Die Bedeutung eines ausreichenden Inhibitorschutzes beleuchteten auch Versuche (43), in denen nachgewiesen wird, daß Lungenparenchym durch leukocytaire Proteasen angedaut werden kann, ein Vorgang, der seinerseits wiederum in vitro durch α_1 -Antitrypsin hemmbar ist. Bei Applikation von Proteasen, die nicht durch α_1 -Antitrypsin hemmbar sind, kann beim Hund eine Überempfindlichkeit der Bronchien gegen konstriktorisch wirkende Substanzen erzeugt werden (44 - 46). Bei all diesen Untersuchungen im Bronchialbereich wurde aber davon ausgegangen, daß der einzige physiologische Schutz vor proteolytischer Aktivität in einer ausreichenden α_1 -Antitrypsinkonzentration zu suchen sei. Da die Bestimmung der antitryptischen Aktivität meist mit immunologischen Methoden im Bronchialsekret vorgenommen wurde, wurde die gleichzeitige Anwesenheit eines niedermolekularen Proteaseninhibitors (47) übersehen, obwohl dieser - wie Untersuchungen bei über 60 Patienten mit und ohne bronchialen Affektionen ergaben (48) - sowohl im Sekret des Gesunden als auch des Kranken über 70 % der Gesamthemmkapazität der Bronchialsekrete darstellt.

Diese Untersuchungen ergaben auch, daß bei Patienten mit bronchialen Affektionen nur 30 % des gesamten vorhandenen Inhibitors in freier Form vorliegen. Die Hauptmenge ist also an Proteasen gebunden. Dies ist ein Zeichen für den vermehrten Anfall von Proteasen in den durch Infektion in besonderem Maße gefährdeten Luftwegen und zugleich ein direkter Beweis für die Wechselwirkung des proteolytischen und inhibitorischen Systems.

Den überwiegend antitryptisch wirksamen Anteil des inhibitorischen Systems stellt dabei im oberen Bereich des Bronchialbaumes der niedermolekulare Inhibitor, während weiter distal der wirksame Hemmstoff das α_1 -Antitrypsin ist. In Übereinstimmung damit steht die Tatsache, daß sich bei α_1 -Antitrypsinmangel nur das Lungenemphysem und nicht, wie auch

erwartet werden müßte, vermehrt Bronchiektasien und Bronchitiden entwickeln (49).

Alle diese Beobachtungen, die die Vorstellungen über die Bedeutung von Proteasen und Inhibitoren bei pathophysiologischen Vorgängen begründet haben, werden weiterhin erhärtet durch die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde. Wie bereits bei Versuchsreihen von Masche, Marcic und Ulmer mit Bronchialsekret, so zeigte sich auch bei unseren Fällen keine Korrelation zwischen α_1 -Antitrypsingehalt im Nasensekret und der Gesamthemmung.

Was letztere betrifft, so kommt es im Verlauf einer Rhinitis parallel mit den subjektiven Beschwerden zu einem Abfall, in schweren Fällen zum völligen Verschwinden des Inhibitors mit Auftreten von proteolytischer Aktivität. Dies ist zum Teil wahrscheinlich Folge einer *functio laesa* der Schleimhaut, von der wir glauben, daß sie die Produktionsstätte des niedermolekularen Inhibitors sein könnte, zum Teil aber auch Folge des massiven Verbrauchs von Inhibitoren durch Komplexbildung mit Leukocytenproteasen. Bei Erkrankungen dieser Art sind schlechte Heilungstendenzen zu beobachten. Häufig werden überdies solche Erkrankungen mit proteasehaltigen Mucolytica behandelt, die das inhibierende System zusätzlich belasten.

Aus diesen Beobachtungen könnte man folgern, daß durch medikamentöse Stimulation der eigenen Inhibitorproduktion oder durch Zufuhr eines Inhibitors mit gleichem Hemmspektrum der physiologische Inhibitorüberschuß wieder hergestellt und so ein therapeutischer Effekt erzielt werden könnte. Von allen bisher getesteten pflanzlichen und tierischen Inhibitoren hat lediglich das α_1 -Antitrypsin die Eigenschaft, leukocytenproteasen zu hemmen. Es dürfte daher interessant sein, diesen Inhibitor für die Anwendung im Nasen- und Nasenhöhlenebereich zu testen.

Angesichts dieser therapeutischen Möglichkeit glauben wir, daß die Bestimmung von komplexgebundenen Inhibitoren in den Sekreten einen Beitrag zur Beurteilung der jeweils vorliegenden Erkrankung und der günstigsten Behandlung liefern kann. Da auch im Harn bei Leukocytenurie und bei anderen Fällen

von Osteomyelitis im Serum α_1 -Antitrypsin-Proteasenkomplexe nachgewiesen werden konnten, scheint speziell die modifizierte quantitative Simultan-Immunoelektrophorese für alle Körpersekrete und Flüssigkeiten zur Aufspürung entzündlicher Vorgänge mit Leukocytenzerfall anwendbar.

Zusammenfassung .

α_1 -Antitrypsin und ein niedermolekularer Inhibitor sind die Bestandteile des antiproteolytischen Systems der oberen Luftwege. Die physiologische Bedeutung ergibt sich aus der Hemmbarkeit leukocytyärer Proteasen durch diese Inhibitoren. Im Verlauf akuter Infekte der oberen Luftwege sinkt der Inhibitorgehalt zunächst ab und kehrt dann erst nach einer überschießenden Produktion wieder zu physiologischen Werten zurück. Bei chronischen Infekten der oberen Luftwege ist der Inhibitorgehalt konstant erniedrigt. Sowohl im akuten als auch im chronischen Fall liegen wechselnde Mengen von Inhibitor in inhibitorisch inaktiver, an Proteasen gebundener Form vor. Der Anteil dieses maskierten Inhibitors an der Gesamthemmung liefert Hinweise für die Stärke entzündlicher Vorgänge. Es werden Methoden beschrieben, mit denen freier und maskierter Inhibitor direkt bestimmt und damit auch die bisher auf Grund indirekter Schlüsse angenommene Wechselwirkung von Proteasen und Proteaseninhibitoren nachgewiesen werden kann.

Literaturverzeichnis.

1. L. Cunningham, Comprehensive Bio- 16, 85 (1965)
chemistry
2. F. Fiedler, E. Werle, Z. physiol. Chem. 349, 942 (1968)
3. Gladner, Laki, I. Amer. Chem. Soc. 80, 1263 (1958)
4. H. Fritz, E. Fink, M. Gebhardt, Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969)
K. Hochstraßer, E. Werle,
5. = 1
6. I. F. Northrop, M. Kunitz, Science 73, 262 (1931)
80, 505 (1934)
I. gen. Physiol. 16, 267 (1932)
7. L. Kunitz, I. gen. Physiol. 21, 601 (1938)
8. L. Kunitz, I. F. Northrop, I. gen. Physiol. 18, 433 (1935)
9. M. Kunitz, I. gen. Physiol. 22, 207 (1936)
10. Mc Donald, M. Kunitz, I. gen. Physiol. 29, 155 (1946)
11. E. Shaw, Methods in Enzymo- 19, 677 (1967)
logy
12. H. Fritz, I. Trautschold, Meth. d. enz. Analyse Verlag Chemie
E. Werle, H. U. Bergmeyer 2. Auflage, Bd. 1,
S 1021-1038
13. E. Werle, I. Trautschold, Annual of the N.Y. 146, 464 (1968)
H. Haendle, H. Fritz, Acad. of Sciences
14. M. Rocha e Silva, Nature 145, 591 (1940)
M. Schachter, Biochem. Pharmac. 10, 87 (1962)
D. I. Holdstocker, A. P. Mathias Brit. I. Pharmac. 17, 149 (1957)
M. Schachter,
A. Herzheimer, M. Schachter, Nature 183, 1510 (1959)
K. D. Bhoola, M. Schachter, I. Physiol. 142, 80 (1959)
K. D. Bhoola, I. D. Calle, I. Physiol. 152, 75 (1960)
M. Schachter,
15. Atlas of Protein (1966)
Sequence and Structure
16. A. Marx, Neue Aspekte der 2, 89 (1967)
Transyloltherapie
17. A. Marx, I. Clemente, E. Werle, Blut 5, 367 (1959)
E. Appel,

18. R. Vogel, I. Trautschold,
E. Werle, Academic Press (1968)
New York-London
19. K. Hochstraßer, H. Maendle,
R. Reichert, E. Werle, Z. physiol. Chem. 352, 954 (1971)
20. K. Hochstraßer, R. Reichert,
M. Matzner, E. Werle, Z. klin. Chem. u. klin.
Biochem. 10, 184 (1972)
21. K. Hochstraßer, R. Reichert,
S. Schwarz, E. Werle, Z. physiol. Chem. 353, (1972)
22. G. Mancini, A. O. Carbonara,
I. F. Heremans Immunochemistry 2, 335 (1965)
23. H. Heimbürger, H. Haupt,
G. H. Schwick, Proc. Int. Res. Conf.
on Proteinase Inh. S1-22 (1971)
Fritz & Tschache Hrsg.
W. de Gruyter Berlin
24. C. B. Laurell Anal. Chem. 15, 45 (1966)
25. K. Ohlsson Scand. J. Clin. Lab.
Invest. 28, 219 (1971)
26. K. Ohlsson Scand. J. Clin. Lab.
Invest. 28, 225 (1971)
27. W. Stephan, U. Frahm, Z. klin. Chem. u. klin.
Biochem. 9, 224 (1971)
28. K. Hochstraßer, R. Schuster,
R. Reichert, H. Heimbürger, Z. physiol. Chem. 353, 1120 (1972)
29. H. Frimmer, Int. Z. klin. Pharm.
ther. Tox. 5, 144 (1971)
30. C. G. Hunter, J. A. Pierce,
J. B. La Borde, J. Amer. Med. Assoc. 205, 93 (1968)
31. H. Heimbürger, H. Haupt, Klin. Wschr. 44, 1196 (1966)
32. C. B. Laurell, Scand. J. Clin. Lab. Inv. 28, 1 (1971)
33. H. G. Oiers, J. Adiseshwarz
H. Heimbürger, D. Straßburger,
J. Frimmer, Dtsch. med. Wschr. 93, 1633 (1968)
34. E. Varpela, A. E. Caris, Ann. Clin. Res. 1, 45 (1971)
35. R. C. Talamo, J. of Allerg. and
Clin. Immunol. 48, 340 (1971)
36. H. G. Oiers, Acta Med. Scand. 175, 17 (1971)
37. H. G. Oiers, A. Adiseshwarz, Ann. Clin. Res. 1, 45 (1971)

38. F. Kueppers, A. G. Hearn, Proc. Soc. Exp. Biol. 121, 1207 (1966)
(N.Y.)
39. F. Kueppers, Humangenetik 5, 54 (1967)
40. F. Kueppers, R. Fallat, Science 165, 899 (1969)
41. K. H. Kilburn, A. R. Dowell, Arch. Intern. Med. 127, 884 (1971)
F. C. Pratt,
42. P. Gross, E. A. Pfitzer, E. Toller, Arch. Environ. Health 11, 50 (1966)
ker, M. A. Babysk, M. Kaschak,
43. I. Lieberman, M. A. Gawad, J. Lab. Clin. Med. 77, 713 (1971)
44. B. Rasche, W. T. Ulmer, Pneumonologie 144, 10 (1971)
45. W. T. Ulmer, M. S. Islam, I. Bakran, Dtsch. Med. Wochschr. 96, 1759 (1971)
46. M. S. Islam, B. Rasche, E. Vastage, Pneumonologie 146, 232 (1971)
W. T. Ulmer,
47. R. Reichert, K. Hochstraßer, Z. Laryng. Rhinol. 51, 190 (1972)
48. R. Reichert, K. Hochstraßer, Pneumonologie 147, 13 (1972)
G. Conradi,
49. R. Reichert, K. Hochstraßer, Pneumonologie 147, (1972)

Lebenslauf

Am 16. Dezember 1948 wurde ich als Sohn des Rudolf Schuster und seiner Ehefrau Marianne, geb. Lechelmayer in Augsburg (Bayern) geboren. Nach dem Umzug meiner Eltern im Jahre 1951 nach München besuchte ich von 1955 - 59 hier die Volksschule an der Plinganserstraße und von 1959 - 68 das Ludwigs-Gymnasium (humanistisches Gymnasium). 1968 erlangte ich dort das Abiturzeugnis. Von 1968 - 74 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Humanmedizin. Im Januar 1974 reichte ich hier den Antrag auf Zulassung zur ärztlichen Prüfung ein, die ich dann am 20. 6. 1974 bestand.

Rudolf Schuster

Unterpfaffenhofen bei München

